# UEBER DIE SYNTHESEN, DIE OPTISCHEN UND CHEMISCHEN EIGENSCHAFTEN SOWIE DIE KATALYTISCHEN WIRKUNGEN DER EISENKOMPLEXSALZE EINIGER PORPHYRINSUBSTITUIERTER PEPTIDE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Bruno Wiemer
aus Insterburg

1961

# UEBER DIE SYNTHESEN, DIE OPTISCHEN UND CHEMISCHEN EIGENSCHAFTEN SOWIE DIE KATALYTISCHEN WIRKUNGEN DER EISENKOMPLEXSALZE EINIGER PORPHYRINSUBSTITUIERTER PEPTIDE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Bruno Wiemer
aus Insterburg

264/61

Gutachter: Prof. Dr. W. Lautsch

Prof. Dr. R. Riemschneider

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Februar 1961

Tag der Promotion: 19. Juli 1961

## Inhaltsübersicht


| | Seite |
|---|---|
| I. Einleitung und Problemstellung | 5 |
| II. Ausführung | |
| A. Synthesen der Fermentmodelle | 10 |
| B. Peptidsynthesen | 16 |
| C. Spektren | 22 |
| D. Katalytische Messungen | 32 |
| E. Diskussion der Ergebnisse | 37 |
| III. Präparativer und experimenteller Teil | |
| A. Fermentmodelle | 41 |
| B. Peptide | 56 |
| C. Katalytische Messungen | 70 |
| IV. Zusammenfassung | 73 |
| V. Literaturverzeichnis | 75 |

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546809_0042

## I. Einleitung und Problemstellung

Durch O. WARBURG (1) wurde mit der Entdeckung der Bedeutung des Fermenteisens für die Zellatmung die Voraussage von BERZELIUS, daß Fermente Katalysatoren seien, die das biologische Geschehen weitgehend beherrschen, bestätigt.

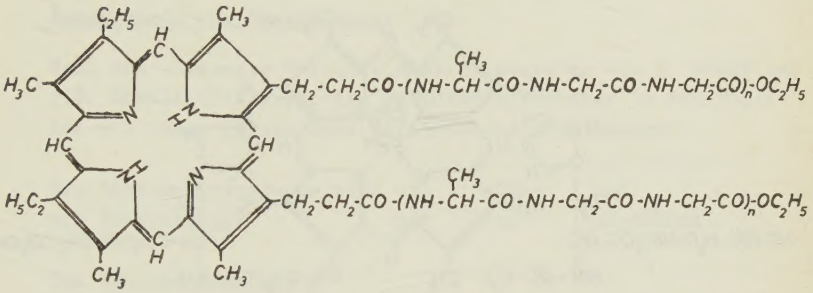
Ueber das Bauprinzip und die Wirkungsweise von Enzymen wurden zwei Theorien aufgestellt. Nach R. WILLSTAETTER und Mitarbeitern (2) besteht das Molekül eines Enzyms aus einem kolloiden Träger (Apoferment) und einer rein chemisch wirkenden aktiven Gruppe (prosthetische Gruppe oder Coferment). Der einzelne kolloide Träger ist entbehrlich, wenn dem Enzym ein geeigneter anderer zur Verfügung steht. Er dient vor allem als Stabilisator für die reaktionsfähigen Gruppen (Trägertheorie). H.v. EULER und Mitarbeiter (3) kamen bei ihren Untersuchungen zu dem Ergebnis, daß die Bindung des Enzyms an das Substrat nicht an der gleichen Stelle erfolgt, an welcher die Spaltung bzw. die vorhergehende amphotere Aufladung erfolgt. Für die Verbindung des Enzyms mit seinem Substrat kommen danach zwei Affinitäten in Betracht (Zwei-Affinitätstheorie).

Um die komplizierte Wirkungsweise von Enzymen zu klären, wurden von vielen Wissenschaftlern Modellversuche unternommen, die sich in der Hauptsache mit der Untersuchung der prosthetischen Gruppen und ihrer einfachen Derivate befaßten. Hier sind auch W. LANGENBECK und seine Mitarbeiter (4) zu nennen, die erfolgreiche Versuche zur Aenderung der katalytischen Eigenschaften an Modellen durchführen konnten, die durch Einführung aktivierender Gruppen in aktive Gruppen erhalten wurden.

W. LAUTSCH und Mitarbeiter (5) kamen bei Untersuchungen an Oxydasemodellen, die sich vorwiegend aus Porphinderivaten als prosthetische Gruppen und verschiedenen, damit fest verbundenen hochmolekularen Trägern aufbauten, zu dem Ergebnis, daß der hochmolekularen Peptidkette eine besondere Bedeutung zukommt. Sie fanden, daß die Polypeptidkette sowohl mit der prosthetischen Gruppe als auch mit dem Substrat in Zwischenstoffbeziehungen tritt, wobei es über Einschlußsysteme in Lösungen zur Veränderung der Redoxpotentiale kommt. Die Möglichkeit der Energiefortleitung über die Peptidkette konnte gezeigt werden. Im Experiment konnte bewiesen werden, daß eine mit einem Redoxsystem verknüpfte Peptidkette Radikalcharakter annehmen kann. Die Deutung des Absinkens der Rotationsdispersion von homodeten symmetrischen Zyklopeptiden in Dichloressigsäure auf Null führte zu einer Theorie über den Mechanismus der Elektronenleitung in Peptidketten.

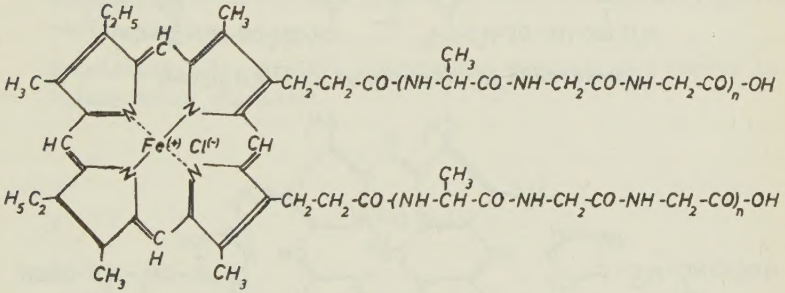
Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, durch Synthese und Untersuchung von Fermentmodellen, bei denen Mesohämin-IX als prosthetische Gruppe über die Propionsäuregruppen peptidartig mit systematisch aufgebauten Peptiden verknüpft war, Aufschluß über die Zwischenstoffbeziehungen der prosthetischen Gruppe mit direkt benachbarten Peptidabschnitten zu erhalten. Dazu sollten zwei Arten von Peptiden mit dem Mesohämin-IX substituiert werden. Einmal Tri- und Hexapeptide, die aus L-Alanin und Glycin aufgebaut waren (Abb. S. 7) und dann Tripeptide, die als erste, zweite bzw. dritte Aminosäure L-Histidin mit dem komplexbildenden Imidazolrest neben Glycin bzw. L-Alanin und Glycin enthielten (Abb. S. 8). Das katalytische Verhalten dieser Fermentmodelle bei der Dehydrierung von p-Phenylendiamin und Brenzcatechin sollte untersucht werden.

*Kupplung der Peptidester mit Mesoporphyrin-IX nach der Phosphorazo-Methode*



*n=1 Mesoporphyrin-IX-bis-(L-alanylglycylglycinäthylester)*
*n=2 Mesoporphyrin-IX-bis-[di-(L-alanylglycylglycin)-äthylester]*

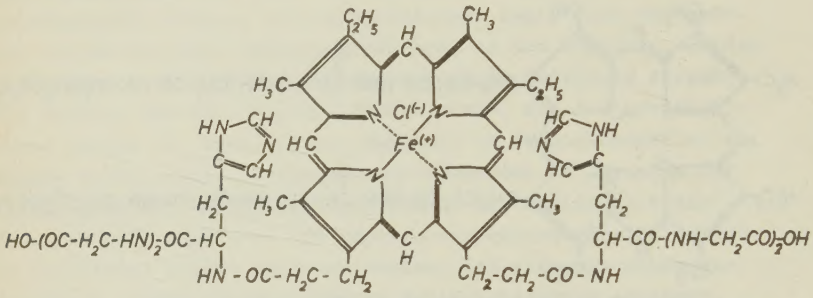
*Abspaltung der Estergruppen mit HBr-Eisessig*
*Einführung des Eisens*



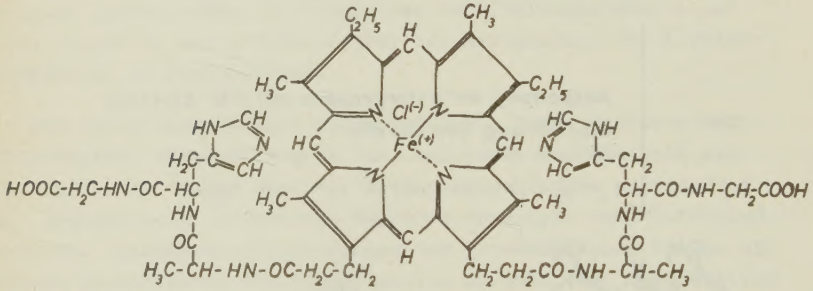
*n=1 Mesohämin-IX-bis-(L-alanylglycylglycin)*
*n=2 Mesohämin-IX-bis-[di-(L-alanylglycylglycin)]*

*Lineare Oxydase-Modelle ohne Fe-benachbarte Komplexbildner*

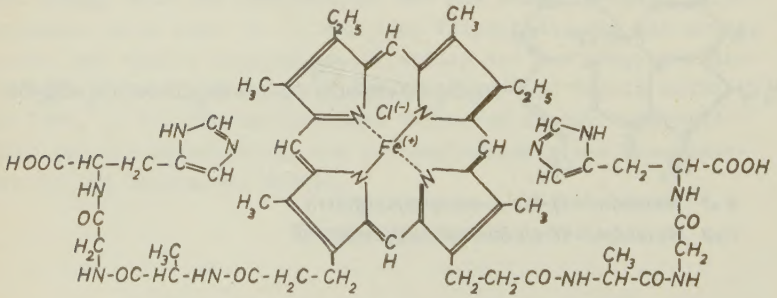
*Kupplung der $N^{1(3)}$Benzyl-L-histidinpeptidbenzylester mit Mesoporphyrin-IX nach der Phosphorazo-Methode. Abspaltung der Benzylgruppen mit Natrium in fl. Ammoniak und Oxydation der dabei entstehenden Porphyrinogene. Einführung des Eisens:*



*Mesohämin-IX-bis-(L-histidylglycylglycin)*



*Mesohämin-IX-bis-(L-alanyl-L-histidylglycin)*



*Mesohämin-IX-bis-(L-alanylglycyl-L-histidin)*

*Lineare Oxydase-Modelle mit Fe-benachbarten Komplexbildnern*

Anmerkungen zur Nomenklatur:

Nach dem allgemein üblichen Abkürzungssystem von E. BRAND und J.T. EDSALL (6) werden die Aminosäurebausteine in den Peptiden mit ihren ersten drei Anfangsbuchstaben benannt.

| | | | |
|---|---|---|---|
| Die Carbobenzoxygruppe wird mit | | -Cbo- | und |
| die Benzylgruppe | mit | -bz- | abgekürzt. |

Die systematisch als

1.3.5.8-Tetramethyl-2.4-diäthyl-6.7-bis(propionyl-L-alanyl-$N^{1(3)}$-benzyl-L-histidylglycinbenzylester)-porphin

zu bezeichnende Verbindung mit peptidartiger Verknüpfung der Propionsäuregruppen des Mesoporphyrin-IX mit L-Alanyl-$N^{1(3)}$-benzyl-L-histidyl-glycinbenzylester wird als

Mesoporphyrin-IX-bis-(L-ala-$N^{1(3)}$-bz-L-his-gly-Obz)

oder als

Mesoporphyrin-IX-bis-(L-alanyl-$N^{1(3)}$-benzyl-L-histidylglycin-benzylester)

bezeichnet. Alle ähnlich aufgebauten Verbindungen werden in dieser Weise abgekürzt.

## II. Ausführung

### A. Synthesen der Fermentmodelle

Verbindungen mit peptidartiger Verknüpfung der Propionsäuregruppen des Mesohämin-IX mit Aminosäuren und Glycylglycin waren schon von K. ZEILE und P. PIUTTI (7) als Modellsubstanzen für die hydrophilen Abbauprodukte des Cytochrom-c synthetisiert worden. Die Substanzen wurden erhalten durch Kupplung von Mesoporphyrin-IX mit Aminosäure- bzw. Peptidestern nach der Säurechloridmethode, Verseifung der Estergruppen mit methanolisch-wässriger Kalilauge oder mit HBr-Eisessig und Einführung von Eisen.

Diese Methode ergab bei der Verwendung höherer Peptidester zu geringe Ausbeuten. Außerdem gelang die Darstellung der Säurechloride von Porphincarbonsäuren mit $PCl_5$ in Phosphoroxychlorid als Lösungsmittel nur bei Farbstoffen mit gesättigten Seitenketten ohne Zersetzungserscheinungen.

Von W. LAUTSCH und W. GEHRMANN (8) waren Verbindungen von Mesoporphyrin-IX mit verschiedenen Aminosäureestern über die Azidmethode dargestellt worden. Kupplungen mit höheren Peptidestern führten zu Produkten, bei denen der Farbstoff nicht peptidartig, sondern über Harnstoffbrücken mit den Peptidestern verbunden war (9).

Kupplungsversuche nach der Carbodiimidmethode (10) zeigten, daß der größte Teil des eingesetzten Mesoporphyrins durch die Bildung von schwer abtrennbaren Harnstoffderivaten blockiert wurde.

Zum Erfolg führte die Phosphorazomethode (11), für die ja Pyridin das günstigste Reaktionsmilieu ist. Pyridin ist gleichzeitig ein hervorragendes Lösungsmittel für Porphin- und Phorbinderivate.

Gearbeitet wurde nach den allgemeinen Vorschriften von St. GOLDSCHMIDT und H. LAUTENSCHLAEGER. Um mit möglichst geringen Lösungsmittelmengen auszukommen, wurden die Farbstoffe bei 50°C i.V. bei Lichtausschluß aus einer Glasfilternutsche in die Phosphorazolösung hineinextrahiert. Das Reaktionsgemisch wurde 3 Stunden auf 50°C erwärmt und nach weiterem Stehen bei Raumtemperatur aufgearbeitet.- Nur bei Verwendung von Phäophorbid-a als Farbstoffkomponente wurde nach der Extraktion nicht erhitzt, um eine teilweise Umwandlung des Phäophorbid-a in Pyrophäophorbid-a zu verhindern. Diese Kupplung wurde vorgenommen, um die Anwendbarkeit der Methode auch bei Verbindungen mit ungesättigten Seitenketten zu zeigen.

Zur Aufarbeitung wurde das Pyridin i.V. abgezogen. Der Rückstand wurde in Eisessig aufgenommen. Nach dem Eingießen in Eiswasser wurden durch Zugabe von Ammonacetatlösung bei möglichst niedrigem $p_H$ die Kupplungsprodukte zusammen mit dem unumgesetzten Farbstoff gefällt. Nach dem Zentrifugieren, Waschen und Trocknen wurde in Pyridin gelöst und über eine Säule von Aluminiumoxyd filtriert, wobei unumgesetzter Farbstoff und Reaktionsprodukte mit noch vorhandenen freien Carboxylgruppen am oberen Rand zurückgehalten wurden, während die gewünschten Produkte durchliefen. Dieses Reinigungsverfahren mußte nur für Mesoporphyrin-IX-bis-$[(L\text{-ala-gly-gly})_2 OC_2H_5]$ abgewandelt werden, da diese Verbindung weder in Pyridin noch in Eisessig löslich war. Hierbei wurde das aus der Reaktionslösung ausgefallene Produkt mit Pyridin und dann mit Wasser gründlich gewaschen, getrocknet und nach dem Lösen in viel erwärmtem Dimethylformamid über Aluminiumoxyd filtriert.

Folgende Farbstoffpeptidester wurden auf diese Weise analysenrein dargestellt:

1) γ-Phylloporphyrin-XV-DL-ala-gly-gly-$OCH_3$ F. 246-248°C
2) Phäophorbid-a-Dl-ala-gly-gly-$OCH_3$ F. 185-189°C
3) Mesoporphyrin-IX-bis-(DL-ala-gly-gly-$OCH_3$) F. 240-242°C

4) Mesoporphyrin-IX-bis-(L-ala-gly-gly-$OC_2H_5$) F. 281-283°C
5) Mesoporphyrin-IX-bis-[(L-ala-gly-gly)$_2$-$OC_2H_5$] F. > 320°C

6) Mesoporphyrin-IX-bis-($N^{1(3)}$-bz-L-his-$OCH_3$) F. 187-189°C
7) Mesoporphyrin-IX-bis-($N^{1(3)}$-bz-L-his-Obz) F. 101-102°C
8) Mesoporphyrin-IX-bis-($N^{1(3)}$-bz-L-his-gly-gly-Obz) F.131,5-133°C
9) Mesoporphyrin-IX-bis-(L-ala-$N^{1(3)}$-bz-L-his-gly-Obz) F. 216-217°C
10) Mesoporphyrin-IX-bis-(L-ala-gly-$N^{1(3)}$-bz-L-his-Obz) F. 211-213°C

Bei der Verwendung eines Ueberschusses von 100 % Peptidester bei der Kupplung betrugen die Ausbeuten 33 bis 80 % der Theorie. Gute Ausbeuten lieferten alle Ansätze mit Benzylhistidinderivaten.

Bei den histidin-haltigen Verbindungen mußte der Ersatz der Imino-H-Atome durch Benzylgruppen in den Imidazolresten vorgenommen werden, um eine Einwirkung des Phosphortrichlorids an dieser Stelle bei der Darstellung der Phosphorazolösungen zu unterbinden.

Als Modellreaktion für die Kupplung von Mesoporphyrin-IX mit $N^{1(3)}$-Benzyl-L-histidinderivaten nach der Phosphorazomethode wurde das schon von M. HUNT und V. du VIGNEAUD (12) nach der Säurechloridmethode dargestellte L-Alanyl-L-histidin·$H_2SO_4$ auf folgendem Wege synthetisiert:

Cbo-L-alanin + $N^{1(3)}$-Benzyl-L-histidin-benzylester-di-p-toluol-sulfonat

↓ Phosphorazomethode in Pyridin

Cbo-L-alanyl-$N^{1(3)}$-benzyl-L-histidinbenzylester

F. 135-136°C $[\alpha]_D^{20} = -20,0 \pm 1°$ (c = 2 in Methanol)

↓ Na in fl. $NH_3$ / $NH_4J$; $H_2SO_4$

L-Alanyl-L-histidin · $H_2SO_4$

F. 183°C $[\alpha]_D^{20} = +14,1 \pm 1°$ (c = 1 in Wasser)

Bei der so erhaltenen Verbindung stimmten der Schmelzpunkt und die spez. Drehung mit den Literaturangaben überein.

Die Beseitigung dieses im Alkalischen sauer reagierenden H-Atoms war für die Reinigung der entsprechenden Substanzen von Vorteil, denn Kupplungsprodukte von Mesoporphyrin-IX mit am Imidazolring ungeschützten Histidinestern wurden auf der

Aluminiumoxydsäule zurückgehalten (8) und ließen sich auf andere Weise nur schwer reinigen (7).

Die Weiterverarbeitung der Mesoporphyrin-IX-bis(peptidester) 4 bis 10 (Tabelle S. 12) erfolgte auf verschiedenen Wegen.

Die Abspaltung der Aethylestergruppen wurde bei den Verbindungen 4 und 5 durch Erwärmen der in 3 n HBr-Eisessig gelösten Substanz auf 60°C in einer Glasbombe durchgeführt. Nach 40 Minuten wurde in kalte ges. Ammonsulfatlösung eingegossen und auf einen $p_H$-Wert von 4,4 eingestellt. Das bei der Verseifung des Tripeptidderivates Ausgefallene wurde nach dem Waschen mit wenig Wasser in 1 n wäßrigem Ammoniak gelöst, filtriert und durch Zugabe von Essigsäure bei $p_H$ = 5,6 erneut ausgefällt. Die Umfällung wurde wiederholt. Die ausgefallenen Reaktionsprodukte des Hexapeptidderivates wurden erst mit 50 %igem wäßrigen Pyridin behandelt. Das Unverseifte wurde abfiltriert, die Pyridinlösung mehrmals mit ges. Ammonsulfatlösung gewaschen, filtriert und i.V. zur Trockne abgezogen. Nach dem Lösen des Rückstandes in 1 n wäßrigem Ammoniak wurde wie bei dem Tripeptidderivat weitergearbeitet. Die so erhaltenen Substanzen waren sehr hydrophil. Sie wurden in Eisessig gelöst und mit Fe(II)acetat in geringem Ueberschuß in Gegenwart von Kochsalz nach der üblichen Methode bei 80°C in die Hämine überführt, die sich als weniger hydrophil erwiesen und die mit $\frac{n}{100}$ HCl und Wasser salzfrei gewaschen werden konnten.

Mesoporphyrin-IX-bis($N^{1(3)}$-bz-L-his-$OCH_3$) wurde mit methylalkoholisch-wäßriger Kalilauge verseift (7) und mit Fe(II)acetat in das Mesohämin-IX-bis($N^{1(3)}$-bz-L-his-OH) umgewandelt.

Die Abspaltung der Benzylgruppen aus den Mesoporphyrin-IX-

bis($N^{1(3)}$-benzylhistidinpeptidbenzylestern) wurde mit Natrium in fl.Ammoniak durchgeführt. Dazu wurden die fein pulverisierten, scharf getrockneten Substanzen in fl. Ammoniak aufgeschlämmt und unter Feuchtigkeits- und Luftausschluß mit einer Lösung von Natrium in fl. Ammoniak bis zur bleibenden Blaufärbung titriert. Die Blaufärbung wurde mit wenig Ammonchlorid beseitigt. Es resultierten farblose bis gelbliche Lösungen. Unter Luftausschluß wurde filtriert. Durch Zugabe von mehr Ammonchlorid wurden die entstandenen Natriumverbindungen zerstört. In Gegenwart von Pyridin und wäßrigem Ammoniak wurden die Porphyrinogenderivate mit Luftsauerstoff zu den Mesoporphyrin-IX-bis(L-histidinpeptiden) oxydiert. Die Ausbeuten betrugen 30 - 40%. Die in großer Menge anfallenden urobilinoiden Zersetzungsprodukte, die bei der Oxydation entstehen, sind in dem $p_H$-Bereich von 3,9 - 5,6, in dem die gewünschten Substanzen ausfallen, sehr gut löslich.

Die Abspaltung der Benzylgruppen mußte mit Natrium in fl. Ammoniak (13)vorgenommen werden, da die Hydrierung in Gegenwart des von R.KUHN und H.J. HAAS (14) beschriebenen Katalysators bei 60°C in Eisessig wohl zu einer Abspaltung der O- und N-Benzylgruppen des $N^{1(3)}$-Benzyl-L-histidinbenzylesters führte, das zugesetzte Mesoporphyrin-IX jedoch über die Stufe des Porphyrinogens hinaus hydriert wurde.

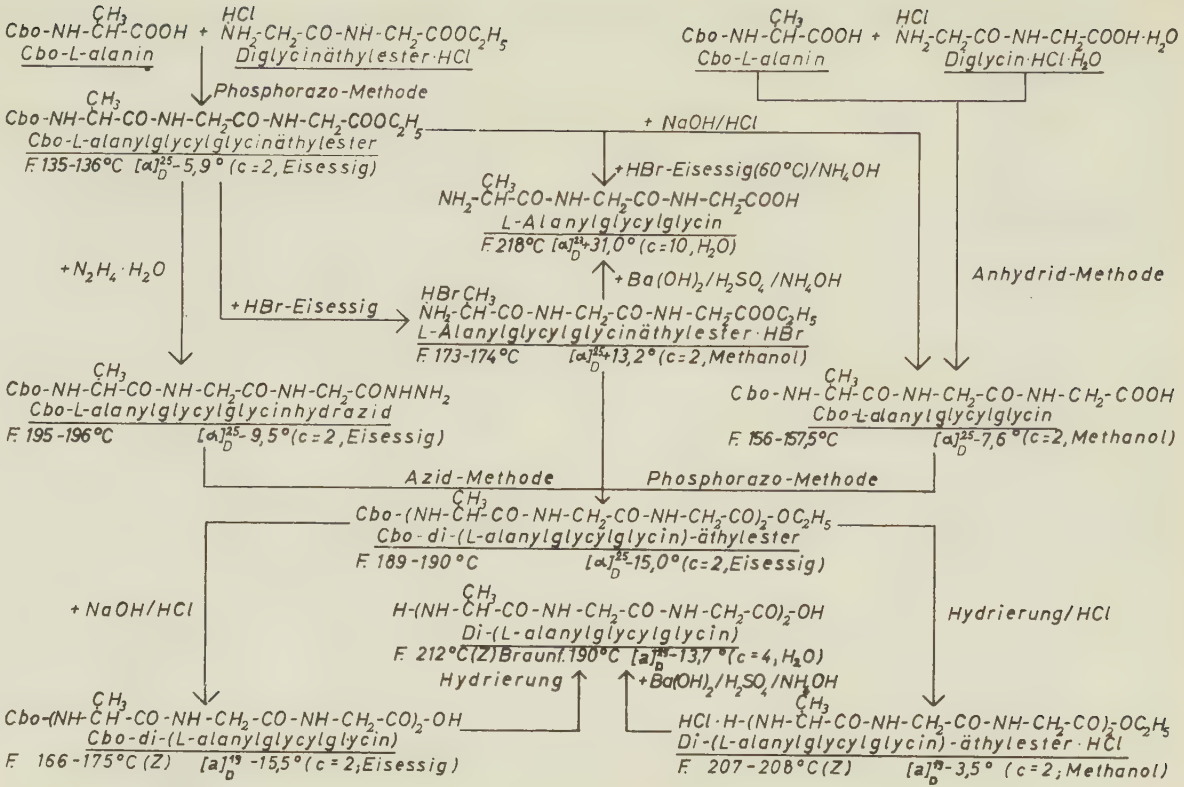
Die Einführung des Eisens erfolgte nach dem schon erwähnten bekannten Verfahren. Kochsalz wurde nicht zugesetzt. Es wurde mit einem Unterschuß an Eisen gearbeitet. Die Abtrennung der entstandenen inneren Hämichromogene (Fe(III)-Hämochromogene, Parahämatine), Verbindungen, bei denen die noch freien Koordinationsstellen des Hämineisens durch die Imidazolringe der Histidinbausteine besetzt sind (27), von den Mesoporphyrinderivaten gelang mit Methanol. Die Hämichromogene sind in der Wärme darin löslich, die eisenfreien Verbindungen nicht.

B. Peptidsynthesen

Die zur Darstellung der nur L-Alanin und Glycin enthaltenden Peptidester und Peptide erforderlichen Zwischenstufen und Synthesewege ergeben sich aus dem Schema auf S. 17. Es wurden die üblichen Peptidsynthesemethoden angewendet: Die Phosphorazomethode (11), die Anhydridmethode (15) und das Azidverfahren (16). Die Carbobenzoxy-Gruppe (17) diente zum Schutz der Amino-Endgruppen. Durch selektive Abspaltung der Estergruppe bzw. der Aminoschutzgruppe von dem Cbo-L-alanylglycylglycin-äthylester und dem Cbo-hexapeptidester wurden jeweils Ausgangsstufen zur Verdopplung der Peptidkette erhalten.

Die Verseifung der Cbo-peptidäthylester mußte durch tropfenweise Zugabe von 0,2 n Natronlauge bei Raumtemperatur vorgenommen werden, wobei die Zugabe des nächsten Tropfens erst nach Entfärbung des zugesetzten Indikators Thymolphthalein erfolgen durfte. Bei unkontrollierter Verseifung oder bei Erhöhung der Temperatur bildeten sich fast ausschließlich Hydantoinderivate. - Dieses Verfahren zur Verseifung empfindlicher Cbo-Peptidester wurde von W. GRASSMANN und E. WUENSCH (18) beschrieben.

Die Abspaltung der Cbo-Gruppen erfolgte mit HBr-Eisessig nach D. BEN-ISHAI und A. BERGER (19). Während das Hydrobromid des Tripeptidesters auf diesem Wege wohlkristallisiert erhalten werden konnte, fiel die entsprechende Verbindung des Hexapeptids als amorphe hygroskopische Substanz an. Ein orientiertes, nicht hygroskopisches Hydrochlorid des Hexapeptidesters konnte jedoch durch Abhydrierung der Cbo-Gruppe in 80 %igem Eisessig mit Wasserstoff in Gegenwart des in Wasser aufhydrierten Bariumsulfat-Palladiumoxyhydrat-Katalysators (14) erhalten werden, wobei der Fortgang der Hydrierung durch Bestimmung der entwickelten $CO_2$-Menge verfolgt wurde. Nach Filtration und dem Abziehen der Essigsäure i.V. wurde in Aetha-


Cbo-NH-CH(CH3)-COOH + HCl NH2-CH2-CO-NH-CH2-COOC2H5
Cbo-L-alanin
Diglycinäthylester·HCl
Phosphorazo-Methode
Cbo-NH-CH(CH3)-CO-NH-CH2-CO-NH-CH2-COOC2H5
Cbo-L-alanylglycylglycinäthylester
F. 135-136°C [α]D25 -5,9° (c=2, Eisessig)
+ N2H4·H2O
+ HBr-Eisessig
Cbo-NH-CH(CH3)-CO-NH-CH2-CO-NH-CH2-CONHNH2
Cbo-L-alanylglycylglycinhydrazid
F. 195-196°C [α]D25 -9,5° (c=2, Eisessig)
HBr CH3
NH2-CH-CO-NH-CH2-CO-NH-CH2-COOC2H5
L-Alanylglycylglycinäthylester·HBr
F. 173-174°C [α]D25 +13,2° (c=2, Methanol)
+ Ba(OH)2/H2SO4/NH4OH
NH2-CH(CH3)-CO-NH-CH2-CO-NH-CH2-COOH
L-Alanylglycylglycin
F. 218°C [α]D22 +31,0° (c=10, H2O)
+ HBr-Eisessig (60°C)/NH4OH
+ NaOH/HCl
Cbo-NH-CH(CH3)-COOH + HCl NH2-CH2-CO-NH-CH2-COOH·H2O
Cbo-L-alanin
Diglycin·HCl·H2O
Anhydrid-Methode
Cbo-NH-CH(CH3)-CO-NH-CH2-CO-NH-CH2-COOH
Cbo-L-alanylglycylglycin
F. 156-157,5°C [α]D25 -7,6° (c=2, Methanol)
Azid-Methode
Phosphorazo-Methode
Cbo-(NH-CH(CH3)-CO-NH-CH2-CO-NH-CH2-CO)2-OC2H5
Cbo-di-(L-alanylglycylglycin)-äthylester
F. 189-190°C [α]D25 -15,0° (c=2, Eisessig)
+ NaOH/HCl
H-(NH-CH(CH3)-CO-NH-CH2-CO-NH-CH2-CO)2-OH
Di-(L-alanylglycylglycin)
F. 212°C (Z) Braunf. 190°C [α]D25 -13,7° (c=4, H2O)
Hydrierung
+ Ba(OH)2/H2SO4/NH4OH
Hydrierung/HCl
Cbo-(NH-CH(CH3)-CO-NH-CH2-CO-NH-CH2-CO)2-OH
Cbo-di-(L-alanylglycylglycin)
F. 166-175°C (Z) [a]D19 -15,5° (c=2; Eisessig)
HCl·H-(NH-CH(CH3)-CO-NH-CH2-CO-NH-CH2-CO)2-OC2H5
Di-(L-alanylglycylglycin)-äthylester·HCl
F. 207-208°C (Z) [a]D23 -3,5° (c=2; Methanol)

nol aufgenommen. Beim Einleiten von HCl fiel das Hydrochlorid aus.

Die Darstellung der freien Peptide erfolgte auf verschiedenen Wegen. Sie gelang auch durch Einwirkung von Bromwasserstoff-Eisessig auf die Cbo-peptidester bei 60°C, da bei dieser Temperatur neben der Carbobenzoxygruppe auch die Aethylestergruppe abgespalten wird.

Im präparativen Teil werden auch die Synthesevorschriften einiger DL-Verbindungen dieser Reihe gegeben.

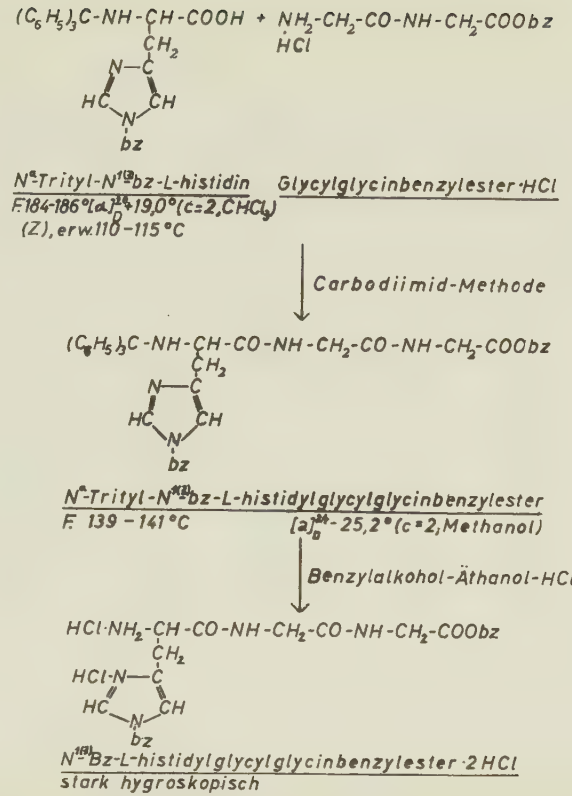
Die Synthesewege zu den histidin-haltigen Peptidestern sind in den Schemata auf S. 19 und auf S. 20 skizziert.

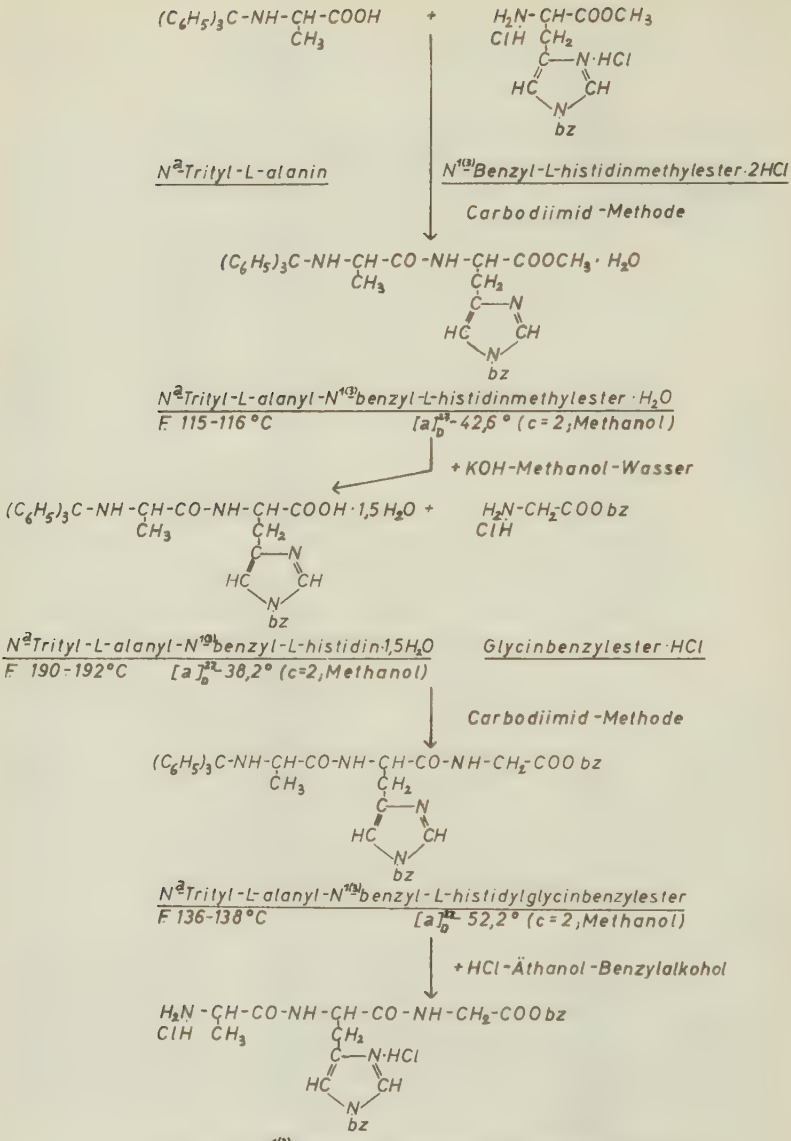
Das $N^{1(3)}$-Benzyl-L-histidin wurde nach V. du VIGNEAUD und O.K. BEHRENS (20) dargestellt.

Die Kopfaminogruppe wurde in allen Fällen mit der Tritylgruppe (21) geschützt. Als Estergruppe der Tripeptidester diente stets die Benzylgruppe. Gekuppelt wurde nach der Carbodiimidmethode (10).

$N^{1(3)}$-Benzyl-L-histidylglycylglycinbenzylesterdihydrochlorid wurde synthetisiert durch Kupplung von $N^{\alpha}$-Trityl-$N^{1(3)}$-benzyl-L-histidin mit Glycylglycinbenzylester (22) und Abspaltung der Tritylgruppe mit HCl-Aethanol in Gegenwart von Benzylalkohol. Der Benzylalkoholzusatz war nötig, um eine Umesterung zu verhindern. $N^{\alpha}$-Trityl-$N^{1(3)}$-benzyl-L-histidin wurde durch Tritylierung von $N^{1(3)}$-Benzyl-L-histidin erhalten.

L-Alanylglycyl-$N^{1(3)}$-benzyl-L-histidinbenzylesterhydrochlorid wurde durch Kupplung des bekannten $N^{\alpha}$-Trityl-L-alanylglycins (23) mit $N^{1(3)}$-Benzyl-L-histidinbenzylester und Abspaltung der Tritylgruppe dargestellt. $N^{1(3)}$-Benzyl-L-histidin-benzylester-di-p-toluolsulfonat wurde durch Veresterung von $N^{1(3)}$-Benzylhistidin mit Benzylalkohol in Gegen-


(C6H5)3C-NH-CH-COOH + NH2-CH2-CO-NH-CH2-COObz
HCl
CH2
N—C
HC CH
N
bz
Nα-Trityl-N(1)bz-L-histidin
F.184-186°[α]D24+19,0°(c=2,CHCl3)
(Z), erw.110-115°C
Glycylglycinbenzylester·HCl
Carbodiimid-Methode
(C6H5)3C-NH-CH-CO-NH-CH2-CO-NH-CH2-COObz
Nα-Trityl-N(1)bz-L-histidylglycylglycinbenzylester
F. 139-141°C
[a]D24-25,2°(c=2;Methanol)
Benzylalkohol-Äthanol-HCl
HCl·NH2-CH-CO-NH-CH2-CO-NH-CH2-COObz
HCl-N—C
N(1)Bz-L-histidylglycylglycinbenzylester·2HCl
stark hygroskopisch
(C6H5)3C-NH-CH-CO-NH-CH2-COOH + NH2-CH-COObz
CH3
2CH3C6H4-SO3H(p)
Nα-Trityl-L-alanylglycin
N(1)Bz-L-histidinbenzylester
-di-p-toluolsulfonat
F.182-184°C[α]D24+9,5°(c=2,CH3OH)
Nα-Trityl-L-alanylglycyl-N(1)bz-L-histidinbenzylester
F. 110-113°C
[a]D25-30,5° (c=2;Methanol)
HCl·NH2-CH-CO-NH-CH2-CO-NH-CH-COObz
L-Alanylglycyl-N(1)bz-L-histidinbenzylester·2HCl
stark hygroskopisch


(C6H5)3C-NH-CH-COOH
CH3
+
H2N-CH-COOCH3
ClH CH2
C—N·HCl
HC CH
N
bz
Nα-Trityl-L-alanin
Nτ(π)-Benzyl-L-histidinmethylester·2HCl
Carbodiimid-Methode
(C6H5)3C-NH-CH-CO-NH-CH-COOCH3 · H2O
CH3
CH2
C—N
HC CH
N
bz
Nα-Trityl-L-alanyl-Nτ(π)-benzyl-L-histidinmethylester · H2O
F. 115-116 °C
[α]D23 -42,6 ° (c = 2; Methanol)
+ KOH-Methanol-Wasser
(C6H5)3C-NH-CH-CO-NH-CH-COOH · 1,5 H2O +
CH3
CH2
C—N
HC CH
N
bz
H2N-CH2-COO bz
ClH
Nα-Trityl-L-alanyl-Nτ(π)benzyl-L-histidin·1,5H2O
F. 190-192°C
[α]D22 -38,2° (c=2; Methanol)
Glycinbenzylester·HCl
Carbodiimid-Methode
(C6H5)3C-NH-CH-CO-NH-CH-CO-NH-CH2-COO bz
CH3
CH2
C—N
HC CH
N
bz
Nα-Trityl-L-alanyl-Nτ(π)benzyl-L-histidylglycinbenzylester
F. 136-138 °C
[α]D22 -52,2° (c = 2; Methanol)
+ HCl-Äthanol-Benzylalkohol
H2N-CH-CO-NH-CH-CO-NH-CH2-COO bz
ClH CH3
CH2
C—N·HCl
HC CH
N
bz
L-Alanyl-Nτ(π)benzyl-L-histidylglycinbenzylester·2HCl
stark hygroskopisch

wart von p-Toluolsulfonsäure und Abdestillation des entstehenden Wassers mit Tetrachlorkohlenstoff gewonnen.

Zur Synthese des Tripeptidesters mit dem $N^{1(3)}$-Benzyl-L-histidinrest in der Mitte wurde das bekannte Dihydrochlorid des $N^{1(3)}$-Benzyl-L-histidinmethylesters (24) verwendet. Die Synthese wurde vom Kopfaminoende ausgehend durchgeführt.

Razemisierungserscheinungen wurden bei den Peptidsynthesen nicht beobachtet.

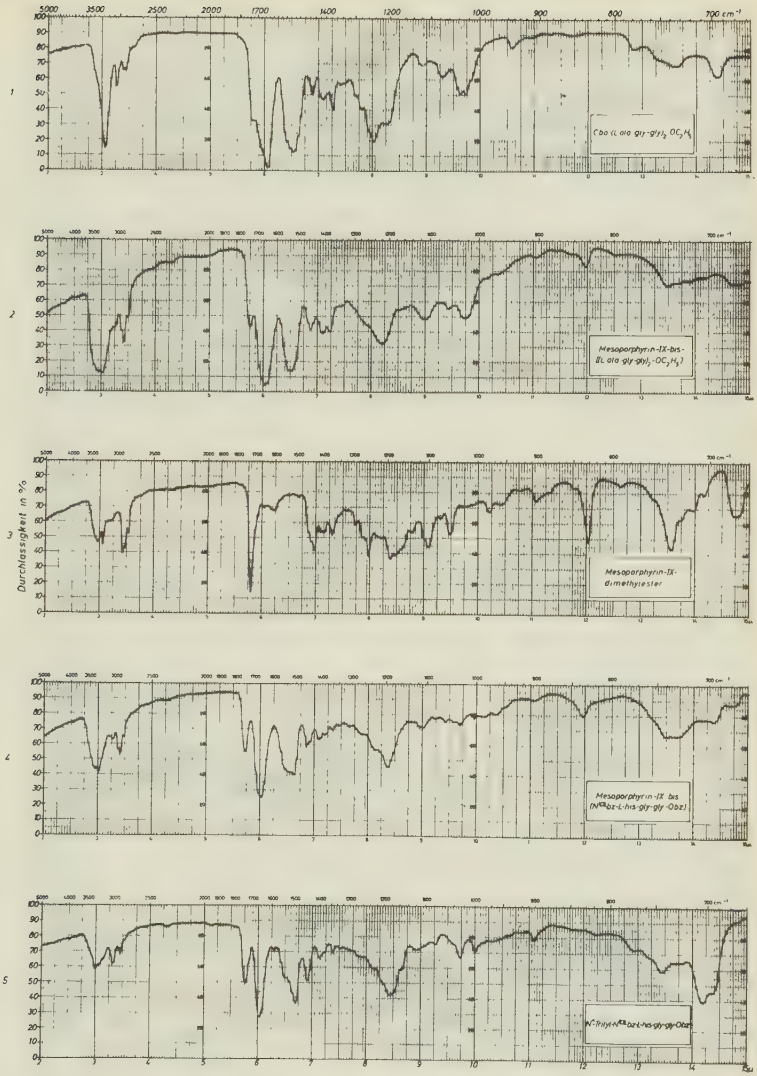
C. Spektren

1. Ultrarotspektren

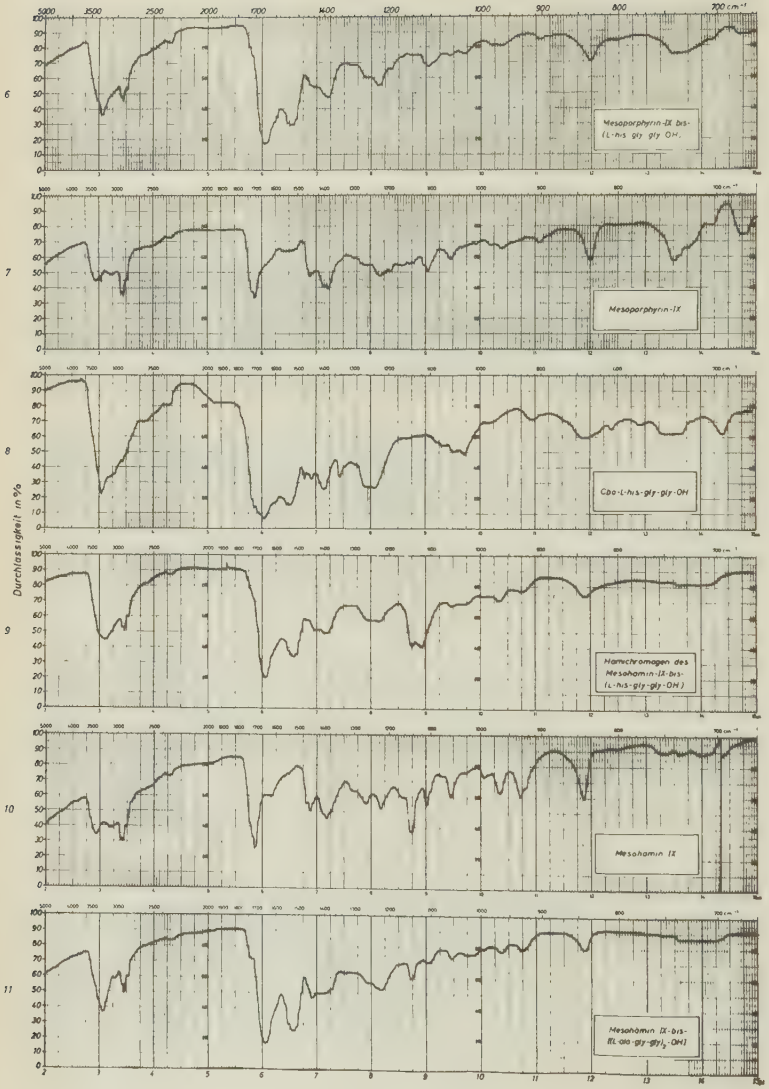
Die Diagramme 1-11 auf den Seiten 23 und 24 geben die Ultrarotspektren einiger charakteristischer Peptidderivate und der daraus synthetisierten Mesoporphyrin-IX- und Mesohämin-IX-abkömmlinge wieder. Die Spektren wurden im Leitz-Infrarotspektographen aufgenommen. Die KBr-Preßlinge wurden in allen Fällen aus 700 mg KBr und 2,5 mg Substanz hergestellt. Sie hatten einen Durchmesser von 22 mm.

Für Mesoporphyrin-IX-dimethylester (D 3) und für Mesoporphyrin-IX (D 7) ist eine scharfe Bande bei 3,05 µ charakteristisch, die sich im Mesohämin-IX (D 10) nicht mehr zeigt. Sie muß deshalb den N-H-Valenzschwingungen im Porphinring zugeordnet werden. Bei den Mesoporphyrinpeptidderivaten (D 2 , D 4 u. D6) wird diese Bande durch die Bande der assoz. NH-Valenzschwingungen der Carbonamidbindungen überlagert, die in dem Bereich von 3,01 - 3,07 µ liegen, wie ein Vergleich mit den Spektren der Peptidderivate zeigt (D 1 , D 5 u. D 8). Als weitere charakteristische Bande tritt beim Mesoporphyrin und bei allen Mesoporphyrinderivaten eine starke Absorption bei 11,95 bis 12,05 µ auf. Auch bei den Häminen (D 9 bis D 11) ist diese Bande zu finden. Allerdings ist sie hier um etwa 0,1 - 0,2 µ nach kürzeren Wellenlängen hin verschoben. Diese Absorption kann den CH-Deformationsschwingungen der Methinbrücken-Wasserstoffe zugeordnet werden. Bei allen Häminen tritt bei 8,7 - 8,75 µ eine Bande auf, die in den Porphyrinen fehlt.

Die Spektren der Porphyrin- und Häminpeptide setzen sich aus den Banden der Komponenten zusammen. In den Spektren der Mesoporphyrin-IX-bis(peptidester) (D 2 u. D 4 ) tritt zu den




Ultrarot-Spektren Tafel 1




Ultrarot-Spektren Tafel 2

Banden des Mesoporphyrins (D 7 ) die schon erwähnte starke und breite Absorption der assoz. NH-Valenzschwingungen bei 3,00 bzw. 3,04 µ. Neben der Bande der CO-Valenzschwingungen der Estergruppen bei 5,73 bzw. 5,75 µ erscheint die starke Amidbande I (CO-Valenzschwingungen der Säureamidgruppen) bei 6,03 µ und die ebenfalls starke Amidbande II (N-H-Deformationsschwingungen der Säureamidgruppen) bei 6,5 µ. Für Mesoporphyrin-IX-bis(L-his-gly-gly-OH) (D 6 ) und für die Mesohämin-IX-bis(peptide) (D 9 u. D 11) ergeben sich sinngemäß die gleichen Bilder, nur daß hier die Bande der CO-Valenzschwingungen der Estergruppen durch die Bande der CO-Valenzschwingungen der Carbonsäuregruppen bei etwa 5,85 µ ersetzt wird, die mit der Amidbande I vereinigt wiedergegeben wird.

In dem Diagramm des Cbo-L-his-gly-gly-OH (D 8) läßt der Verlauf der Kurve zwischen 3 u. 4 µ sowie der Uebergang zwischen der Amidbande I und der Amidbande II auf Salzbildung schließen.

Ein Teil der bisher nicht erwähnten Banden läßt sich wie folgt zuordnen:

| | |
|---|---|
| 3,28 - 3,30 µ | C-H-Valenzschwingungen des aromatischen Kerns |
| 3,35 - 3,54 µ | verschiedene Banden der CH-Valenzschwingungen der $CH_3$ - und $CH_2$ -Gruppen |
| 6,85 µ | asymm. CH-Deformationsschwingung $-CH_2-$ |
| 6,89 µ | asymm. CH-Deformationsschwingung $-C-CH_3$ |
| 7,1 µ | Methylengruppen in Nachbarschaft von -CO- |
| 7,27 µ | symm. CH-Deformationsschwingung $-C-CH_3$ |
| 8,20 - 8,47 µ | C=O-Valenzschwingungen der Estergruppen |
| 9,73 µ | charakteristische Bande der Diglycinstruktur |

Zwischen 8,9 und 10 μ sowie zwischen 13 und 15 μ liegen bei den entsprechenden Verbindungen Banden der monosubstituierten Benzolringe. (Vergleichsdaten aus (25)).

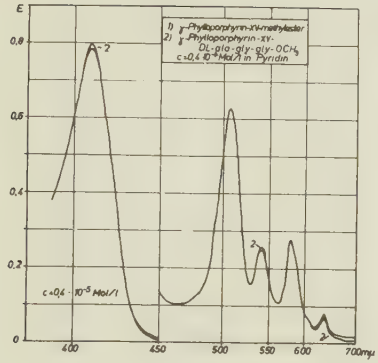
2. Spektren im sichtbaren Gebiet.

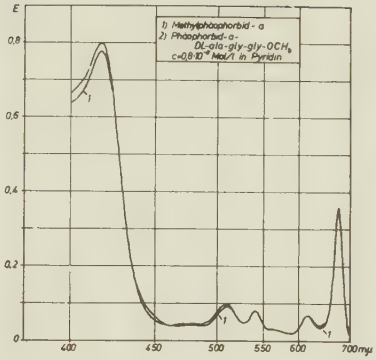
Die Porphin- und Phorbinderivate mit Aminosäure- oder Tripeptidestern geben in Pyridin bzw. in Dimethylformamid Spektren, die in der Lage und Höhe der Banden bei gleichen molaren Konzentrationen mit den Spektren der entsprechenden reinen Farbstoffester unter Berücksichtigung der Fehler der Meßanordnungen übereinstimmen.

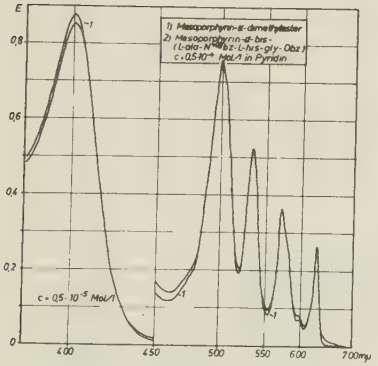
Die Abbildungen auf S. 27 geben eine Auswahl von Spektren wieder, die mit dem Beckman-Photospektrometer DK 2 bei einer Schichtdicke von 1 cm aufgenommen wurden.

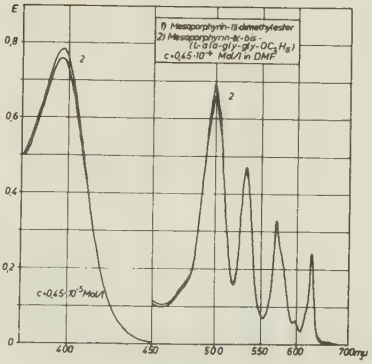
Die in den Tabellen auf S. 28 und S. 29 zusammengefaßten Werte der molaren Extinktionskoeffizienten einiger Maxima wurden durch direkte Messung des eingestrahlten und des durchfallenden Lichtes unter Berücksichtigung des Einflusses des reinen Lösungsmittels bestimmt. In den Tabellen auf S. 29 sind auch molare Extinktionskoeffizienten für die Mesoporphyrin-IX-bis-(histidinpeptide) angegeben, die durch Behandlung der abgedeckten Substanzen mit Natrium in fl. Ammoniak usw. erhalten wurden. Diese Verbindungen zeigen ebenso wie das Mesoporphyrin-IX-bis($N^{1(3)}$-bz-L-his-OH) und wie der Mesoporphyrin-IX-bis(hexapeptidester) eine weniger gute Uebereinstimmung der molaren Extinktionskoeffizienten mit den entsprechenden Werten der Vergleichssubstanzen. Diese Abweichungen können auf mehr oder weniger starke Assoziationsvorgänge in den Lösungen oder auf eine Beeinflussung der absorbierenden Verbindungsbestandteile durch die Peptidketten zurückgeführt werden.

Mesoporphyrin-IX-bis $[(L\text{-ala-gly-gly})_2\text{-}OC_2H_5]$ gibt zwar unter der Annahme, daß noch zwei Moleküle Dimethylformamid nach dem Trocknen bei 75°C i.V. festgehalten werden, mit der Vergleichssubstanz übereinstimmende Werte, die Analysenwerte sprechen


E
1) Phyllopurpurin-XV-methylester
2) Phyllopurpurin-XV-DL-gla-gly-gly-OCH3
c=0,4·10⁻⁵ Mol/l in Pyridin
c=0,4 · 10⁻⁵ Mol/l
400
450
500
550
600
700mμ


E
1) Methylphäophorbid - a
2) Phäophorbid-a-DL-gla-gly-gly-OCH3
c=0,8·10⁻⁵ Mol/l in Pyridin
400
450
500
550
600
700mμ


E
1) Mesoporphyrin-IX-dimethylester
2) Mesoporphyrin-IX-bis-(L-gla-N^im-Bz-L-his-gly-Obz)
c=0,5·10⁻⁵ Mol/l in Pyridin
c = 0,5 · 10⁻⁵ Mol/l
400
450
500
550
600
700mμ


E
1) Mesoporphyrin-IX-dimethylester
2) Mesoporphyrin-IX-bis-(L-gla-gly-gly-OC2H5)
c=0,45·10⁻⁵ Mol/l in DMF
c=0,45·10⁻⁵ Mol/l
400
450
500
550
600
700mμ

**Molare Extinktionskoeffizienten von Porphin- und Phorbinpeptidesterderivaten in Pyridin**

| Substanz | $c$ [Mol/l] Pyridin | $\lambda_1$ [mμ] | $\varepsilon_1$ [l/Mol·cm] | $\lambda_2$ [mμ] | $\varepsilon_2$ [l/Mol·cm] | $c_{Soret} = c \cdot 10^{-1}$ $\lambda_3$ [mμ] | $\varepsilon_3$ [l/Mol·cm] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| γ-Phylloporphyrin-XV-methylester | $7{,}78 \cdot 10^{-5}$ | 573,0 | $0{,}617 \cdot 10^{4}$ | 503,0 | $1{,}545 \cdot 10^{4}$ | 407,8 | $2{,}030 \cdot 10^{5}$ |
| γ-Phylloporphyrin-XV-DL-ala-gly-gly $OCH_3$ | $5{,}10 \cdot 10^{-5}$ | 574,4 | $0{,}592 \cdot 10^{4}$ | 502,1 | $1{,}497 \cdot 10^{4}$ | 407,4 | $1{,}985 \cdot 10^{5}$ |
| Methylphäophorbid-a | $7{,}42 \cdot 10^{-5}$ | 610,6 | $0{,}824 \cdot 10^{4}$ | 507,0 | $1{,}122 \cdot 10^{4}$ | 414,2 | $1{,}021 \cdot 10^{5}$ |
| Phäophorbid-a DL-ala-gly-gly $OCH_3$ | $10{,}15 \cdot 10^{-5}$ | 610,6 | $0{,}816 \cdot 10^{4}$ | 507,0 | $1{,}070 \cdot 10^{4}$ | 415,8 | $1{,}053 \cdot 10^{5}$ |
| Mesoporphyrin-IX-dimethylester | $6{,}54 \cdot 10^{-5}$ | 567,4 | $0{,}647 \cdot 10^{4}$ | 495,8 | $1{,}438 \cdot 10^{4}$ | 401,4 | $1{,}680 \cdot 10^{5}$ |
| Mesoporphyrin-IX-bis-(DL-ala-gly-gly-$OCH_3$)·$H_2O$ | $6{,}31 \cdot 10^{-5}$ | 567,4 | $0{,}635 \cdot 10^{4}$ | 496,7 | $1{,}379 \cdot 10^{4}$ | 401,4 | $1{,}580 \cdot 10^{5}$ |
| Mesoporphyrin-IX-bis-($N^{1(3)}$-bz-L-his-$OCH_3$) | $5{,}94 \cdot 10^{-5}$ | 564,8 | $0{,}677 \cdot 10^{4}$ | 495,8 | $1{,}380 \cdot 10^{4}$ | 401,8 | $1{,}666 \cdot 10^{5}$ |
| Mesoporphyrin-IX-bis-($N^{1(3)}$-bz-L-his-Obz) | $7{,}53 \cdot 10^{-5}$ | 566,0 | $0{,}646 \cdot 10^{4}$ | 496,7 | $1{,}419 \cdot 10^{4}$ | 401,8 | $1{,}579 \cdot 10^{5}$ |
| Mesoporphyrin-IX-bis-($N^{1(3)}$-bz-L-his-gly-gly-Obz)·$H_2O$ | $10{,}02 \cdot 10^{-5}$ | 566,0 | $0{,}650 \cdot 10^{4}$ | 496,7 | $1{,}449 \cdot 10^{4}$ | 401,4 | $1{,}700 \cdot 10^{5}$ |
| Mesoporphyrin-IX-bis-(L-ala-$N^{1(3)}$-bz-L-his-gly-Obz)·$H_2O$ | $6{,}37 \cdot 10^{-5}$ | 566,0 | $0{,}644 \cdot 10^{4}$ | 496,7 | $1{,}431 \cdot 10^{4}$ | 401,8 | $1{,}696 \cdot 10^{5}$ |
| Mesoporphyrin-IX-bis-(L-ala-gly-$N^{1(3)}$-bz-L-his-Obz)·$H_2O$ | $5{,}92 \cdot 10^{-5}$ | 567,4 | $0{,}655 \cdot 10^{4}$ | 496,7 | $1{,}465 \cdot 10^{4}$ | 401,4 | $1{,}782 \cdot 10^{5}$ |

Molare Extinktionskoeffizienten von Mesoporphyrin-IX-bis-(peptidestern) in Dimethylformamid

| Substanz | c [Mol/l] DMF | $\lambda_1$ [mμ] | $\varepsilon_1$ [l/Mol·cm] | $\lambda_2$ [mμ] | $\varepsilon_2$ [l/Mol·cm] | $c_{Soret} = c \cdot 10^{-1}$ $\lambda_3$ [mμ] | $\varepsilon_3$ [l/Mol·cm] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Mesoporphyrin-IX-di-methylester | $6{,}94 \cdot 10^{-5}$ | 564,8 | $0{,}695 \cdot 10^{4}$ | 494,0 | $1{,}445 \cdot 10^{4}$ | 396,5 | $1{,}702 \cdot 10^{5}$ |
| Mesoporphyrin-IX-bis-(L-ala-gly-gly-$OC_2H_5$) | $6{,}21 \cdot 10^{-5}$ | 564,8 | $0{,}691 \cdot 10^{4}$ | 494,0 | $1{,}469 \cdot 10^{4}$ | 396,2 | $1{,}766 \cdot 10^{5}$ |
| Mesoporphyrin-IX-bis-[(L-ala-gly-gly)$_2$ $OC_2H_5$] | $6{,}05 \cdot 10^{-5}$ | 564,8 | $0{,}629 \cdot 10^{4}$ | 494,0 | $1{,}324 \cdot 10^{4}$ | 396,2 | $1{,}517 \cdot 10^{5}$ |
| ·1 DMF | $5{,}74 \cdot 10^{-5}$ | 564,8 | $0{,}662 \cdot 10^{4}$ | 494,0 | $1{,}400 \cdot 10^{4}$ | 396,2 | $1{,}600 \cdot 10^{5}$ |
| ·2 DMF | $5{,}47 \cdot 10^{-5}$ | 564,8 | $0{,}697 \cdot 10^{4}$ | 494,0 | $1{,}468 \cdot 10^{4}$ | 396,2 | $1{,}680 \cdot 10^{5}$ |

Molare Extinktionskoeffizienten von Mesoporphyrin-IX-bis-(peptiden) in 50 %igem wäßrigen Pyridin

| Substanz | c [Mol/l] Pyr./$H_2O$ = 1/1 | $\lambda_1$ [mμ] | $\varepsilon_1$ [l/Mol·cm] | $\lambda_2$ [mμ] | $\varepsilon_2$ [l/Mol·cm] | $c_{Soret} = c \cdot 10^{-1}$ $\lambda_3$ [mμ] | $\varepsilon_3$ [l/Mol·cm] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Mesoporphyrin-IX | $7{,}06 \cdot 10^{-5}$ | 567,4 | $0{,}495 \cdot 10^{4}$ | 496,7 | $1{,}145 \cdot 10^{4}$ | 398,0 | $1{,}414 \cdot 10^{5}$ |
| Mesoporphyrin-IX-bis-($N^{(3)}$-bz-L-his-OH) | $6{,}16 \cdot 10^{-5}$ | 567,4 | $0{,}573 \cdot 10^{4}$ | 496,7 | $1{,}152 \cdot 10^{4}$ | 399,0 | $1{,}304 \cdot 10^{5}$ |
| Mesoporphyrin-IX-bis-(L-his-OH) | $6{,}89 \cdot 10^{-5}$ | 567,4 | $0{,}514 \cdot 10^{4}$ | 496,7 | $1{,}117 \cdot 10^{4}$ | 399,4 | $1{,}225 \cdot 10^{5}$ |
| Mesoporphyrin-IX-bis-(L-his-gly-gly-OH) | $6{,}14 \cdot 10^{-5}$ | 567,4 | $0{,}567 \cdot 10^{4}$ | 496,7 | $1{,}179 \cdot 10^{4}$ | 399,0 | $1{,}396 \cdot 10^{5}$ |
| Mesoporphyrin-IX-bis-(L-ala-L-his-gly-OH) | $6{,}38 \cdot 10^{-5}$ | 566,0 | $0{,}540 \cdot 10^{4}$ | 496,7 | $1{,}160 \cdot 10^{4}$ | 398,7 | $1{,}370 \cdot 10^{5}$ |
| Mesoporphyrin-IX-bis-(L-ala-gly-L-his-OH) | $6{,}55 \cdot 10^{-5}$ | 566,0 | $0{,}559 \cdot 10^{4}$ | 496,7 | $1{,}210 \cdot 10^{4}$ | 398,0 | $1{,}436 \cdot 10^{5}$ |

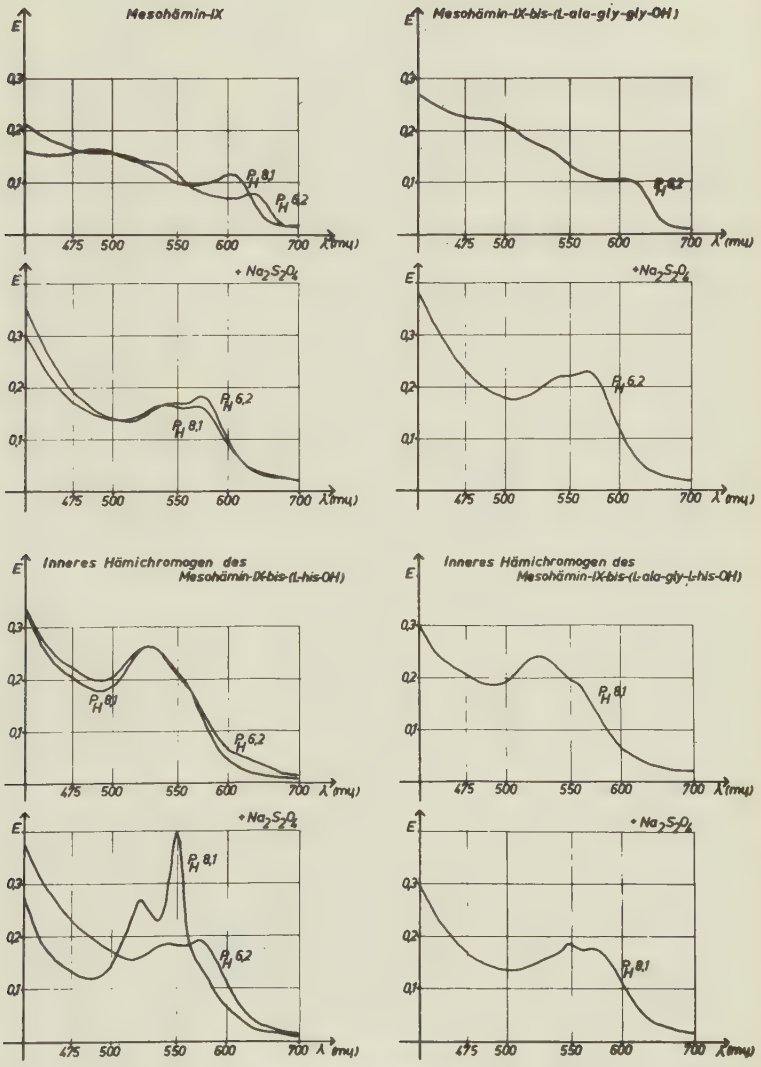
jedoch für das Vorliegen der reinen Verbindung (siehe S.45).

Die histidin-haltigen Mesoporphyrin-IX-bis(peptide) zeigen nach scharfem Trocknen in wäßrigem Pyridin eine kleine unscharfe Bande um 650 mμ, die bei frisch ausgefällten Präparaten kaum in Erscheinung tritt. Aus diesem Grunde wurden zur Darstellung der Eisenkomplexsalze nur frisch umgefällte und schonend getrocknete Substanzen verwendet.

Auf S. 31 ist eine Anzahl typischer Spektren der eisenhaltigen Fermentmodelle wiedergegeben. Diese Spektren wurden in den Pufferlösungen aufgenommen, in welchen auch die katalytischen Messungen durchgeführt wurden. Die Konzentration betrug bei allen Aufnahmen etwa $4 \cdot 10^{-5}$ Mol/l, die Küvettenstärke 1 cm.

Die Verbindungen ohne Komplexbildner in den Peptidketten geben in Phosphatpuffern der $p_H$-Werte 6,2, 7,4 und 8,1 Spektren, die in Abhängigkeit vom $P_H$ als mehr oder weniger starke Uebergänge der Hämin-Spektren in die Hämatin-Spektren zu deuten sind. Die Reduktion mit Natriumdithionit führt zu Häm-Spektren. Dieses spektrale Verhalten zeigt auch das Mesohämin-IX-bis($N^{1(3)}$-bz-L-his-OH).

Sämtliche Verbindungen mit Komplexbildnern in den Peptidketten geben bei den $p_H$-Werten 6,2, 7,4 und 8,1 Hämichromogen-Spektren. Durch Reduktion entstehen bei $p_H$ = 6,2 die Häme. Bei $p_H$ = 7,4 und 8,1 zeigen sich die Banden der Hämochromogene. Eine deutliche Ausnahme macht hierbei nur die Verbindung mit den Histidinresten an den Carboxylenden der Tripeptidketten. Dieses Fermentmodell gibt nach der Reduktion auch bei den $p_H$-Werten 7,4 und 8,1 das Häm-Spektrum mit einer geringen Andeutung der Hämochromogenbande bei 549 mμ. Der Uebergang vom Hämichromogen-Spektrum zu diesem Spektrum erfolgt, mit dem Auge an dem typischen Farbumschlag bei der Zugabe des Natriumdithionits für eine kurze Zeitspanne deutlich erkennbar, über die Hämochromogenstufe.




Spektren in Phosphatpuffer

D. Katalytische Messungen

Die Oxydase-Wirkung der nach den geschilderten Verfahren dargestellten Fermentmodelle wurde gegenüber p-Phenylendiamin und Brenzcatechin geprüft. Die Messungen wurden in Phosphatpuffern bei drei verschiedenen $p_H$-Werten durchgeführt. Es wurde mit Luftsauerstoff bei 30°C gearbeitet. Der Dehydrierungsvorgang wurde durch Messung des Sauerstoffverbrauchs nach der manometrischen Methode (26) verfolgt. Die Substratmenge, gelöst in 5 ml Puffer, betrug $10^{-4}$ Mol, der Katalysatorzusatz $10^{-7}$ Mol, was 5,585 γ komplexgebundenem Eisen entspricht.

Die Tabelle auf S. 33 enthält eine Zusammenstellung der Ergebnisse. Auf Zeile 1 sind die gemessenen Substrat-Blindwerte aufgetragen. Zeile 2, d.h. Nr. 4, gibt die erhaltenen Werte bei gleichzeitiger Anwesenheit von Mesohämin-IX an. Die Zeilen 3 bis 5 (Nr.6 a - 6 c) beziehen sich auf Messungen in Gegenwart von Modellen, die als Hämine vorliegen, die Zeilen 6 bis 9 (Nr. 6 d - 6 g) auf Messungen in Gegenwart von inneren Hämichromogenen. Als katalytische Wirkung wird die Differenz zwischen dem Sauerstoffverbrauch in Gegenwart eines Katalysators und dem Substratblindwert bezeichnet. Die dritte Spalte bei den einzelnen Substraten gibt an, wieviel Male die katalytische Wirkung der Modelle der katalytischen Wirkung des reinen Mesohämin-IX entspricht.

Die Betrachtung der katalytischen Wirkungen zeigt, daß die Häminmodelle die Dehydrierung von p-Phenylendiamin katalysieren; und zwar am stärksten bei $p_H$=6,4. Das Mesohämin-IX-bis(hexapeptid) (6 b) katalysiert am besten. Es folgt in der Wirkung das Mesohämin-IX-bis(tripeptid) (6 a), während Mesohämin-IX-bis-($N^{1(3)}$-bz-L-His-OH) (6 c) - dieses Modell

*Ergebnisse der Versuche zur katalytischen Oxydation von p-Phenylendiamin und Brenzcatechin mit Luftsauerstoff bei 30°C in Gegenwart von 5,585 γ Modell-Eisen.*

| Nr. | | Versuchsansätze in 5 ml Phosphatpuffer | p-Phenylendiamin | | | | Brenzcatechin | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | pH | Verbrauch $mm^3 O_2/h$ | Katalyt. Wirkung $mm^3 O_2/h$ | $\frac{KW_{Modell}}{KW_{Mesoh.}}$ | pH | Verbrauch $mm^3 O_2/h$ | Katalyt. Wirkung $mm^3 O_2/h$ | $\frac{KW_{Modell}}{KW_{Mesoh.}}$ |
| 1 | | $10^{-4}$ Mol Substrat | 6,4 | 0,0 | - | - | 6,2 | 3,0 | - | - |
| | | | 7,5 | 2,5 | - | - | 7,4 | 42,0 | - | - |
| | | | 8,2 | 4,5 | - | - | 8,1 | 123,0 | - | - |
| 4 | | " + $10^{-7}$ Mol Mesohämin-IX | 6,4 | 7,5 | 7,5 | - | 6,2 | 3,0 | 0 | - |
| | | | 7,5 | 14,0 | 11,5 | - | 7,4 | 42,0 | 0 | - |
| | | | 8,2 | 13,5 | 9,0 | - | 8,1 | 131,0 | 8,0 | - |
| 6a | Hämine | " + " Mesohämin-IX-bis-(L-ala-gly-gly-OH) | 6,4 | 25,0 | 25,0 | 3,33 | 6,2 | 3,0 | 0 | - |
| | | | 7,5 | 21,5 | 19,0 | 1,67 | 7,4 | 42,0 | 0 | - |
| | | | 8,2 | 17,0 | 12,5 | 1,39 | 8,1 | 131,0 | 8,0 | 1,00 |
| 6b | Hämine | " + " Mesohämin-IX-bis-[$(L\text{-ala-gly-gly})_2$-OH] | 6,4 | 29,5 | 29,5 | 3,94 | 6,2 | 3,0 | 0 | - |
| | | | 7,5 | 30,5 | 28,0 | 2,43 | 7,4 | 42,0 | 0 | - |
| | | | 8,2 | 17,0 | 12,5 | 1,39 | 8,1 | 128,0 | 5,0 | 0,63 |
| 6c | Hämine | " + " Mesohämin-IX-bis-($N^{1(3)}$bz-L-his-OH) | 6,4 | 20,0 | 20,0 | 2,67 | 6,2 | 3,0 | 0 | - |
| | | | 7,5 | 19,5 | 17,0 | 1,48 | 7,4 | 42,0 | 0 | - |
| | | | 8,2 | 15,0 | 10,5 | 1,16 | 8,1 | 131,0 | 8,0 | 1,00 |
| 6d | Hämichromogene | " + " Mesoh.-IX-bis-(L-his-OH) | 6,4 | 0,0 | 0 | 0 | 6,2 | 3,0 | 0 | - |
| | | | 7,5 | 2,5 | 0 | 0 | 7,4 | 42,0 | 0 | - |
| | | | 8,2 | 4,5 | 0 | 0 | 8,1 | 154,0 | 31,0 | 3,87 |
| 6e | Hämichromogene | " + " Mesoh.-IX-bis-(L-his-gly-gly-OH) | 6,4 | nicht gemessen | | | 6,2 | 3,0 | 0 | - |
| | | | 7,5 | | | | 7,4 | 42,0 | 0 | - |
| | | | 8,2 | | | | 8,1 | 150,5 | 27,5 | 3,44 |
| 6f | Hämichromogene | " + " Mesoh.-IX-bis-(L-ala-L-his-gly-OH) | 6,4 | 4,0 | 4,0 | 0,53 | 6,2 | 3,0 | 0 | - |
| | | | 7,5 | 6,5 | 4,0 | 0,35 | 7,4 | 42,0 | 0 | - |
| | | | 8,2 | 5,5 | 1,0 | 0,11 | 8,1 | 152,0 | 29,0 | 3,63 |
| 6g | Hämichromogene | " + " Mesoh.-IX-bis-(L-ala-gly-L-his-OH) | 6,4 | 7,5 | 7,5 | 1,00 | 6,2 | 3,0 | 0 | - |
| | | | 7,5 | 8,5 | 6,0 | 0,52 | 7,4 | 42,0 | 0 | - |
| | | | 8,2 | 4,5 | 0 | 0 | 8,1 | 143,0 | 20,0 | 2,50 |

bildet keinen Hämichromogenkomplex - am schwächsten katalysiert. Die Wirkungen sind bei $p_H$ = 7,5 schwächer und bei $p_H$ = 8,2 nur noch wenig größer als die Wirkung des Mesohämin-IX.

Die Hämichromogene katalysieren die Dehydrierung des p-Phenylendiamins nicht (6 d) bzw. schwächer (6 f und 6 g) als Mesohämin-IX. Am relativ besten katalysiert die Verbindung mit dem endständigen Histidin (6 g), deren inneres Hämochromogen, wie schon erwähnt, selbst bei $p_H$ = 8,1 nicht beständig ist. Die geringen katalytischen Wirkungen sinken vom Sauren zum Alkalischen hin wie bei den Häminen.

Bei Brenzcatechin als Substrat entsprechen die katalytischen Wirkungen der Häminmodelle (6 a - 6 c) etwa der katalytischen Wirkung des Mesohämins. Eine schwache Katalyse findet, ebenso wie beim Mesohämin-IX, nur in den Lösungen vom $P_H$ = 8,1 statt.

Die Hämichromogene (6 d - 6 g) katalysieren bei demselben $p_H$-Wert wesentlich stärker als Mesohämin-IX. Die relativ schwächste katalytische Wirkung zeigt das Modell mit den Histidinresten an den Carboxylenden der Tripeptidketten (6 g), das von den Hämichromogenen die stärkste Wirkung gegenüber p-Phenylendiamin zeigt. In Lösungen der $p_H$-Werte 6,2 und 7,4 wird die Dehydrierung des Brenzcatechins nicht katalysiert.

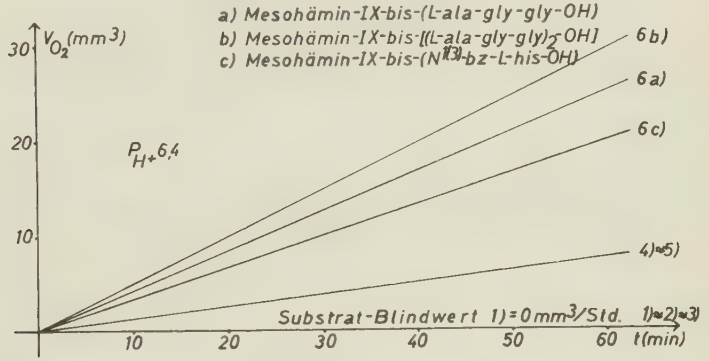
Die Abbildungen auf S. 35 und 36 geben in graphischer Darstellung die Meßwerte für die katalytisch wirksamen Kombinationen wieder. Aufgetragen ist der Sauerstoffverbrauch in Abhängigkeit von der Zeit. Die Substratblindwerte sind abgezogen. Zusätze von Aminosäuren bzw. Peptiden in der entsprechenden Art und Menge zu den reinen Substratlösungen (Nr.2) oder zu den Mesohämin-IX und Substrat enthaltenden Ansätzen (Nr.5) zeigen keine beschleunigenden oder hemmenden Wirkungen. Ebensowenig wird durch Zugabe von 5,585 γ Eisen (III)ionen die Dehydrierung der Substrate katalysiert.

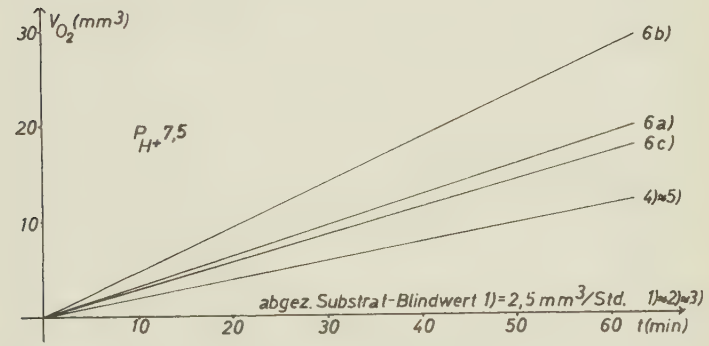
## Oxydase-Wirkung gegenüber p-Phenylendiamin

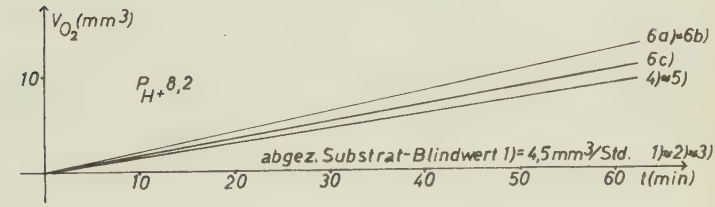
bei 30°C

1) $10^{-4}$ Mol Substrat in 5 ml Phosphatpuffer
2) " " $+2 \cdot 10^{-7}$ Mole Peptid bzw. AS-Derivat " "
3) " " + $10^{-7}$ Mol $Fe^{+++}$ (5,585 γ) " "
4) " " + " Mesohämin-IX " "
5) " " + " Mesohämin-IX + Peptid (wie 2) " "
6) " " + " Modell " "

a) Mesohämin-IX-bis-(L-ala-gly-gly-OH)
b) Mesohämin-IX-bis-[(L-ala-gly-gly)$_2$-OH]
c) Mesohämin-IX-bis-($N^{(3)}$-bz-L-his-OH)



## Oxydase-Wirkung gegenüber Brenzcatechin

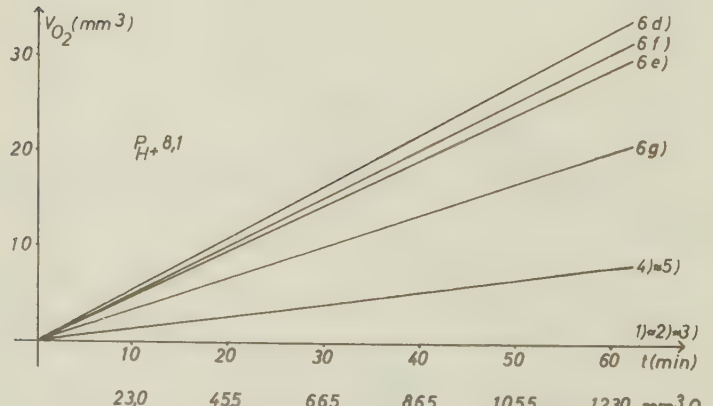
bei 30°C

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 1) | $10^{-4}$ Mol | Substrat | | in 5 ml | Phosphatpuffer |
| 2) | " | " | $+2 \cdot 10^{-7}$ Mole | Aminosäure | " " |
| 3) | " | " | $+ 10^{-7}$ Mol | $Fe^{+++}$ (5,585 $\gamma$) | " " |
| 4) | " | " | + " | Mesohämin-IX | " " |
| 5) | " | " | + " | Mesohämin-IX + A-sre (wie 2) | " " |
| 6) | " | " | + " | Modell | " " |

d) Hämichromogen des Mesohämin-IX-bis-(L-his-OH)
e) " " " Mesohämin-IX-bis-(L-his-gly-gly-OH)
f) " " " Mesohämin-IX-bis-(L-ala-L-his-gly-OH)
g) " " " Mesohämin-IX-bis-(L-ala-gly-L-his-OH)

$P_{H^+}$ 6,2: Der Sauerstoffverbrauch ist für die Kombinationen 2) bis 6g) gleich dem Substrat-Blindwert 1) = 3 $mm^3 O_2$/Std.

$P_{H^+}$ 7,4: Der Sauerstoffverbrauch ist für die Kombinationen 2) bis 6g) nahezu gleich dem Substrat-Blindwert 1) = 42 $mm^3 O_2$/Std.




abgez. Substrat-Blindwerte für die einzelnen Meßpunkte ($P_{H^+}$ 8,1)

E. Diskussion der Ergebnisse

Die optischen und katalytischen Messungen führten zu den auf S. 38 zusammengefaßten Ergebnissen.

Danach zeigen die zwei Gruppen von Fermentmodellen eine gewisse Substratspezifität bei gleichzeitiger $p_H$-Abhängigkeit: Die Hämine katalysieren die Dehydrierung des p-Phenylendiamins am stärksten bei $p_H$=6,4, die Hämichromogene beschleunigen die Oxydation des Brenzcatechins bei $p_H$=8,1. Die Wirkungen der Hämine gegenüber Brenzcatechin und die der Hämichromogene gegenüber p-Phenylendiamin sind wesentlich kleiner.

Für diese Erscheinungen sind, wie nicht anders zu erwarten, die oxydierten Stufen der Fermentmodelle verantwortlich, da im reduzierten Zustand bei $p_H$=6,2 sowohl die Verbindungen ohne als auch die Verbindungen mit Komplexbildner in den Peptidketten als Häme vorliegen, die Dehydrierung des p-Phenylendiamins in diesem $p_H$-Bereich praktisch jedoch nur von den Häminmodellen katalysiert wird.

Eine genauere Betrachtung der katalytischen Wirkungen der Häminmodelle gegenüber p-Phenylendiamin sowie gegenüber Brenzcatechin zeigt gewisse Unterschiede, die darauf hinweisen, daß nicht bei beiden Substraten eine direkte Wechselwirkung der Substratmoleküle mit dem Fermenteisen die Ursache der Katalysen sein muß.

Beim p-Phenylendiamin sinkt die katalytische Wirkung der Modelle vom Sauren zum Alkalischen hin. Mesohämin-IX hat dagegen ein Maximum bei $p_H$=7,5. Die Verbindung mit den längsten Peptidketten zeigt den stärksten katalytischen Effekt.

Gegenüber Brenzcatechin verhalten sich die Häminmodelle wie Mesohämin-IX. Die Verbindung mit den längsten Peptidketten zeigt hier eine geringere katalytische Wirkung als die anderen Hämine.

| Nr. | Fermentmodelle | Spektren | | Katalytische Wirkungen gegenüber | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | p-Phenylendiamin | | | Brenzcatechin | | |
| | | oxyd. | red. | $p_H$ 6,4 | 7,5 | 8,2 | 6,2 | 7,4 | 8,1 |
| 1 | Mesohämin-IX | $p_H$ 6,2 Hämine ↓ $p_H$ 8,1 Hämatine | $p_H$ 6,2 7,4 8,1 Häme | 7,5 | 11,5 | 9,0 | 0 | 0 | 8,0 |
| 2 | Mesohämin-IX-bis-[(L-ala-gly-gly)$_2$-OH] | | | 29,5 | 28,0 | 12,5 | 0 | 0 | 5,0 |
| 3 | Mesohämin-IX-bis-(L-ala-gly-gly-OH) | | | 25,0 | 19,0 | 12,5 | 0 | 0 | 8,0 |
| 4 | Mesohämin-IX-bis-($N^{1(3)}$-bz-L-his-OH) | | | 20,0 | 17,0 | 10,5 | 0 | 0 | 8,0 |
| 5 | Mesoh.-IX-bis-(L-his-OH) | $p_H$ 6,2 7,4 8,1 Hämichromogene | $p_H$ 6,2 Häme $p_H$ 7,4 u. 8,1 Hämochromogene | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 31,0 |
| 6 | Mesoh.-IX-bis-(L-his-gly-gly-OH) | | | - | - | - | 0 | 0 | 27,5 |
| 7 | Mesoh.-IX-bis-(L-ala-L-his-gly-OH) | | | 4,0 | 4,0 | 1,0 | 0 | 0 | 29,0 |
| 8 | Mesoh.-IX-bis-(L-ala-gly-L-his-OH) | | $p_H$ 6,2 Häm $p_H$ 7,4 u. 8,1 Mischspektren Häm + Hämochromogen | 7,5 | 6,0 | 0 | 0 | 0 | 20,0 |
| | | | | $mm^3$ $O_2$/h | | | | | |

Diese Befunde sprechen dafür, daß die katalytische Dehydrierung des Brenzcatechins über eine direkte Wechselwirkung des Substrats mit dem Fermenteisen erfolgt. Die geringere katalytische Wirkung des Mesohämin-IX-bis-[(L-ala-gly-gly)$_2$-OH] ist mit einer teilweisen Abschirmung des Fermenteisens durch die langen Peptidketten zu erklären.

Als Erklärung für die starken Oxydase-Wirkungen der Häminmodelle gegenüber p-Phenylendiamin kann ein Elektronentransport über die Peptidketten in Betracht gezogen werden, wie er von W. LAUTSCH und Mitarbeitern (28) schon mehrfach zur Diskussion gestellt wurde. Diese Auffassung erklärt das Ausbleiben des Wirkungsabfalls durch sterische Hinderung beim Vorhandensein längerer Peptidketten. Sie erklärt gleichzeitig die erhöhte katalytische Wirkung der peptidsubstituierten Hämine durch das Angebot einer vermehrten Zahl von Reaktionsorten für die Substratmoleküle. Der Uebergang der Elektronen von den polarisierten Peptidketten auf das Hämineisen müßte dann über die polarisierte Form der prosthetischen Gruppe (29) erfolgen.

Ebenso können jedoch für dieses unterschiedliche Verhalten der Häminmodelle gegenüber den beiden Substraten auch alleine mehr oder weniger starke Abdeckungserscheinungen in Abhängigkeit vom $p_H$-Wert verantwortlich sein, wenn man unterstellt, daß die Dehydrierung der Substratmoleküle nur beim Vorliegen einer ausreichenden Anzahl der entsprechenden Ionenformen katalytisch beeinflußbar ist (p-Phenylendiamin $p_H$ 6,4; Brenzcatechin $p_H$ 8,1). Die starken katalytischen Wirkungen der Häminmodelle gegenüber p-Phenylendiamin bei $p_H$=6,4 wären dann als Folge der Veränderungen des Redoxpotentials des Mesohämin-IX durch die angehängten Peptidketten bei gleichzeitiger freier Zugänglichkeit des Fermenteisens zu deuten.

Hierfür sprechen auch die geringen katalytischen Wirkungen der Hämichromogenmodelle Nr. 7 und 8 gegenüber p-Phenylendiamin, die ohne Zweifel den dissoziierten Anteilen dieser Kom-

plexe zugesprochen werden müssen. Am relativ besten katalysiert hier die Verbindung Nr. 8, deren innerer Hämochromogenkomplex (Kryptonschale des Zentralatoms) nicht beständig ist und bei der deshalb auch eine größere Labilität des Hämichromogenkomplexes (35 Elektronen) zu erwarten ist.

Diese Verbindung hat gegenüber Brenzcatechin den relativ kleinsten katalytischen Effekt, während das innere Hämichromogen des Mesohämin-IX-bis(L-histidin) - dieses Fermentmodell katalysiert die Dehydrierung des p-Phenylendiamins garnicht - die größte katalytische Wirkung zeigt. Daraus ist zu schließen, daß für die Beschleunigung der Dehydrierung des Brenzcatechins durch Hämichromogen-Fermentmodelle der Komplex selbst von ausschlaggebender Bedeutung ist. Es muß angenommen werden, daß das Brenzcatechin mit dem Imidazolring in Verbindung tritt und daß der Elektronenübergang vom Substrat über den Imidazolring zum Fermenteisen erfolgt. Für die Abführung des Elektrons vom Fermenteisen zum Sauerstoff hin ist der gleiche Weg denkbar.

Die Möglichkeit des Elektronentransfers zum Fermenteisen über Komplexbildner wurde von W. LAUTSCH und Mitarbeitern (28) schon bei verschiedenen Untersuchungen an Fermentmodellen in Betracht gezogen. Die von W. LAUTSCH und E. BOEDEFELD (30) nachgewiesene Radikalotropie bei Hämichromogenkomplexen spricht ebenfalls dafür. Auch von H. THEORELL (31) und Mitarbeitern wurde schon die Elektronenübermittlerrolle des Imidazolrings diskutiert.

Genaueren Afschluß über die Vorgänge bei den beobachteten Katalysen können jedoch nur weitere Untersuchungen geben.

## III. Präparativer und experimenteller Teil

### A. Fermentmodelle

#### Ausgangssubstanzen

γ-Phylloporphyrin-XV (32) wurde aus Phäophorbid-a(33) durch Erhitzen mit methylalkoholischem Kali und anschließende Aether/Salzsäure-Fraktionierung gewonnen. Mesoporphyrin-IX(34) wurde durch Reduktion von Protoporphyrin-IX mit Ameisensäure und Palladium sowie Reinigung über Aether/Salzsäure dargestellt. Die für die Vergleichsspektren verwendeten Methylester dieser Verbindungen wurden zur Reinigung über eine Aluminiumoxydsäule geschickt.

#### Vorschrift zur Kupplung von Porphin- und Phorbin-carbonsäuren mit Aminosäure- oder Peptidestern nach der Phosphorazomethode

4 mMol des fein pulverisierten, scharf getrockneten Aminosäure- oder Peptidesterhydrohalogenids wurden in 4 ml über Bariumoxyd getrocknetes und frisch destilliertes Pyridin (Merck reinst oder p.a.) eingetragen. Nach dem Kühlen in Eiswasser wurden unter weiterer Kühlung und unter Feuchtigkeitsausschluß 2 mMol Phosphortrichlorid (0,176 ml bei 20°C), gelöst in 3 ml Pyridin, langsam unter Schütteln dazugetropft. 60 Min. wurde nun bei Raumtemperatur unter öfterem Umschütteln stehen gelassen. Nach Zugabe von weiteren 5 ml Pyridin wurde die Farbstoffcarbonsäure (1 mMol Dicarbonsäure bzw. 2 mMol Monocarbonsäure) unter Feuchtigkeits- und Lichtaus-

schluß bei vermindertem Druck (50 mm Hg; 50°C Wasserbadtemperatur) in die Lösung der Phosphorazoverbindung hineinextrahiert. 3 Stdn. wurde weiterhin auf 50°C erwärmt.

Nach Stehen über Nacht bei Raumtemperatur wurde das Pyridin i.V. abgezogen. Der Rückstand wurde in Eisessig aufgenommen und unter Rühren in 1 Liter Eiswasser gegossen. Durch vorsichtige Zugabe von Ammonacetatlösung wurde das Kupplungsprodukt zusammen mit dem nicht umgesetzten Farbstoff bei möglichst niedrigem $p_H$ (3,9 - 4,2) ausgefüllt. Auf der Zentrifuge wurde erst mit Ammonacetat-Essigsäure-Puffer vom $p_H$ 4,2 und dann mit Wasser gewaschen. Bei der Kupplung mit nicht in Wasser löslichen freien Estern wurde die Umfällung wiederholt. Nach dem Trocknen wurde in Pyridin gelöst, über eine kurze Säule von Aluminiumoxyd (Woelm neutral) filtriert und i.V. eingeengt. Beim Stehen der konz. Lösungen über konz. Schwefelsäure wurden in fast allen Fällen Kristalle erhalten. Umkristallisiert wurde aus reinstem Pyridin.

Nach diesem Verfahren wurden folgende Verbindungen dargestellt:

1.3.5.8-γ-Pentamethyl-2.4-diäthyl-7-propionyl-DL-alanylglycylglycinmethylester-porphin

o d e r

γ-Phylloporphyrin-XV-DL-alanylglycylglycinmethylester

Ansatz: 1,020 g (2 mMol) γ-Phylloporphyrin-XV
0,868 g (4 mMol) DL-Alanylglycylglycinmethylesterhydrochlorid (35)

Ausbeute: 0,580 g = 41 % der Theorie

F. 246 - 248°C (Kofler) Aus Pyridin in Gegenwart von Methanol Nadeln, die bei Behandlung mit Aether zerfallen.

$C_{40}H_{49}O_5N_7$ MG: 707,85

Zur Analyse wurde bei 50°C i.V. getrocknet.

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Berechnet: | C 67,87 % | H 6,99 % | N 13,85 % | $OCH_3$ 4,38 % |
| Gefunden: | 68,00 % | 7,27 % | 13,77 % | 4,45 % |

1.3.5.8-Tetramethyl-4-äthyl-2-vinyl-9-oxo-10-carbmethoxy-7-propionyl-DL-alanylglycylglycinmethylester-phorbin

o d e r

Phäophorbid-a-DL-alanylglycylglycinmethylester

Ansatz: 1,188 g (2 mMol) Phäophorbid-a
0,868 g (4 mMol) DL-Alanylglycylglycinmethylesterhydrochlorid

Der Kupplungsansatz wurde nicht 3 Stdn auf 50°C erhitzt, sondern nach der Extraktion 60 Stdn bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Ausbeute: 0,522 g = 33 % der Theorie
F. 185 - 189°C (Kofler) Prismen

$C_{43}H_{49}O_8N_7$ MG: 791,88

Zur Analyse wurde bei 75°C i. Hv. getrocknet

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Berechnet: | C 65,22 % | H 6,24 % | N 12,38 % | $OCH_3$ 7,84 % |
| Gefunden: | 65,46 % | 6,20 % | 12,77 % | 7,20 % |

1.3.5.8-Tetramethyl-2.4-diäthyl-6.7-bis(propionyl-DL-alanylglycylglycinmethylester)-porphin

o d e r

Mesoporphyrin-IX-bis(DL-alanylglycylglycinmethylester)

Ansatz: 0,567 g (1 mMol) Mesoporphyrin-IX
0,868 g (4 mMol) DL-Alanylglycylglycinmethylesterhydrochlorid

Ausbeute: 0,560 g = 57 % der Theorie

F.. 240 – 242°C (Kofler) Mikrokristallin, seidiges Glänzen in der Aufschlämmung..

$C_{50}H_{64}O_{10}N_{10} \cdot H_2O$ MG: 983,11

Zur Analyse wurde bei 50°C i. Hv. getrocknet.

Berechnet: C 61,08 % H 6,77 % N 14,25 % $OCH_3$ 6,31 % $(1H_2O)$

Gefunden: 61,50 % 6,77 % 14,31 % 6,47 %

1.3.5.8-Tetramethyl-2.4-diäthyl-6.7-bis (propionyl-L-alanylglycylglycinäthylester)-porphin

o d e r

Mesoporphyrin-IX-bis(L-alanylglycylglycinäthylester)

Ansatz: 0,567 g (1 mMol) Mesoporphyrin-IX
1,249 g (4 mMol) L-Alanylglycylglycinäthylesterhydrobromid

Ausbeute: 0,457 g = 45 % der Theorie

F.. 281 – 283°C (Kofler) Mikrokristallin, ohne deutliche Kristallform

$C_{52}H_{68}O_{10}N_{10}$ MG: 993,14

Zur Analyse wurde bei 75°C i. Hv. getrocknet.

Berechnet: C 62,88 % H 6,90 % N 14,11 %
Gefunden: 62,69 % 7,11 % 14,40 %

1.3.5.8-Tetramethyl-2.4-diäthyl-6.7-bis(propionyl-L-alanylglycylglycyl-L-alanylglycylglycinäthylester)-porphin

o d e r

Mesoporphyrin-IX-bis(L-alanylglycylglycyl-L-alanylglycylglycinäthylester

Ansatz: 0,567 g (1 mMol) Mesoporphyrin-IX
1,130 g (2,27 mMol) L-Alanylglycylglycyl-L-alanylglycylglycinäthylesterhydrobromid

Das aus Pyridin ausgefallene Produkt wurde mit Pyridin und Wasser gründlich gewaschen. Nach dem Trocknen wurde in der Wärme in viel Dimethylformamid gelöst und über Aluminiumoxyd chromatographiert.

Ausbeute: 500 mg = 34,8 % der Theorie

F. schmilzt nicht bis 320°C  Kugelige Aggregate ohne deutliche Kristallform

$C_{66}H_{90}O_{16}N_{16}$  MG: 1363,57

$C_{69}H_{97}O_{17}N_{17}$  MG: 1436,60 (· 1 DMF)

Zur Analyse wurde bei 75 °C i. Hv. getrocknet.

| | | | |
|---|---|---|---|
| Berechnet: | C 58,13 % | H 6,65 % | N 16,44 % |
| | 57,68 % | 6,81 % | 16,58 % (· 1 DMF) |
| Gefunden: | 57,94 % | 6,77 % | 16,10 % |

0,9 % Rstd. bei der C/H-Best.; 0,5 % Rstd. bei der N-Best.

Ein Vergleich der molaren Extinktionskoeffizienten des Mesoporphyrin-IX-dimethylesters mit den entsprechenden Werten dieser Verbindung läßt auch die Annahme eines DMF-Solvats zu.

1.3.5.8-Tetramethyl-2.4-diäthyl-6.7-bis(propionyl-$N^{1(3)}$-benzyl-L-histidinmethylester)-porphin

o d e r

Mesoporphyrin-IX-bis($N^{1(3)}$-benzyl-L-histidinmethylester)

Ansatz: 0,567 g (1 mMol) Mesoporphyrin-IX
1,329 g (4 mMol) $N^{1(3)}$-Benzyl-L-histidinmethylesterdihydrochlorid

Ausbeute: 0,839 g = 80 % der Theorie

F. 187 - 189°C (Kofler)  feine Nadeln

$C_{62}H_{68}O_6N_{10}$  MG: 1049,24

Zur Analyse wurde bei 75°C i. Hv. getrocknet.

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Berechnet: | C 70,97 % | H 6,53 % | N 13,35 % | $OCH_3$ 5,92 % |
| Gefunden: | 70,90 % | 6,37 % | 13,56 % | 5,52 % |

1.3.5.8-Tetramethyl-2.4-diäthyl-6.7-bis (propionyl-$N^{1(3)}$-benzyl-L-histidinbenzylester)-porphin

o d e r

Mesoporphyrin-IX-bis($N^{1(3)}$-benzyl-L-histidinbenzylester)

Ansatz: 0,567 g (1 mMol) Mesoporphyrin-IX
2,719 g (4 mMol) $N^{1(3)}$-Benzyl-L-histidinbenzylester-di-p-toluolsulfonat

Ausbeute: 0,846 g = 70,4 % der Theorie

F. 101 – 102°C (Kofler) Stäbchen

$C_{74}H_{76}O_6N_{10}$ MG: 1201,43

Zur Analyse wurde bei 75°C i. Hv. getrocknet.

| | | | |
|---|---|---|---|
| Berechnet: | C 73,98 % | H 6,38 % | N 11,66 % |
| Gefunden: | 73,79 % | 6,81 % | 11,49 % |

1.3.5.8-Tetramethyl-2.4-diäthyl-6.7-bis(propionyl-$N^{1(3)}$-benzyl-L-histidylglycylglycinbenzylester)-porphin

o d e r

Mesoporphyrin-IX-bis($N^{1(3)}$-benzyl-L-histidylglycylglycinbenzylester)

Ansatz: 0,567 g (1 mMol) Mesoporphyrin-IX
2,090 g (4 mMol) $N^{1(3)}$-Benzyl-L-histidylglycylglycinbenzylester · 2 HCl

Ausbeute: 1,005 g = 69,4 % der Theorie

F. 131,5 – 133°C (Kofler) Plättchen

$C_{82}H_{88}O_{10}N_{14} \cdot 1\ H_2O$ MG: 1447,65

Zur Analyse wurde i. Hv. bei 75°C getrocknet.

Berechnet: C 68,03 % H 6,27 % (· 1 $H_2O$)
Gefunden: 67,81 % 6,51 %

1.3.5.8-Tetramethyl-2.4-diäthyl-6.7-bis (propionyl-L-alanyl-$N^{1(3)}$-benzyl-L-histidylglycinbenzylester)-porphin

o d e r

Mesoporphyrin-IX-bis(L-alanyl-$N^{1(3)}$-benzyl-L-histidylglycin-benzylester)

Ansatz: 0,567 g (1 mMol) Mesoporphyrin-IX
2,146 g (4 mMol) L-Alanyl-$N^{1(3)}$-benzyl-L-histidylglycinbenzylester · 2 HCl

Ausbeute: 0,885 g = 60 % der Theorie

F. 216 – 217°C (Kofler) Stäbchen

$C_{84}H_{92}O_{10}N_{14} \cdot 1\ H_2O$ MG: 1475,70

Zur Analyse wurde bei 75°C i. Hv. getrocknet.

Berechnet: C 68,36 % H 6,42 % N 13,29 % (· 1 $H_2O$)
Gefunden: 68,54 % 6,32 % 13,04 %

1.3.5.8-Tetramethyl-2.4-diäthyl-6.7-bis-(propionyl-L-alanyl-glycyl-$N^{1(3)}$-benzyl-L-histidinbenzylester)-porphin

o d e r

Mesoporphyrin-IX-bis(L-alanylglycyl-$N^{1(3)}$-benzyl-L-histidin-benzylester)

Ansatz: 0,567 g (1 mMol) Mesoporphyrin-IX
2,146 g (4 mMol) L-Alanylglycyl-$N^{1(3)}$-benzyl-L-histidinbenzylester · 2 HCl

Ausbeute: 0,953 g = 64,6 % der Theorie

F. 211 - 213°C (Kofler) Stäbchen

$C_{84}H_{92}O_{10}N_{14} \cdot 1\ H_2O$ MG: 1475,70

Zur Analyse wurde bei 75°C i. Hv. getrocknet:

Berechnet: C 68,36 % H 6,42 % N 13,29 % ($\cdot 1\ H_2O$)
Gefunden: 68,09 % 6,30 % 13,26 %

Vorschrift zur Abspaltung der N- und O-Benzylgruppen von den abgedeckten Meso-IX-bis-(histidintripeptid)-Verbindungen

0,3 mMol der sehr fein pulverisierten, trockenen Substanz wurden in 100 ml getrocknetes und destilliertes, flüssiges $NH_3$ eingetragen. Feuchtigkeitsausschluß! Diese Suspension in flüssigem $NH_3$ wurde durch eine Kältemischung auf etwa -35°C gehalten. Durch eine Rohrverbindung wurde nun aus einem kalibrierten Kolben eine etwa 0,2 n Lösung von Na in flüssigem $NH_3$ in kleinen Portionen bis zur bleibenden Blaufärbung in die turbinierte Suspension gedrückt. Die Blaufärbung durch unverbrauchtes Natrium trat nach Zugabe von 30 bis 35 ml ein. Die Kühlung wurde entfernt. Durch Zugabe von wenig $NH_4Cl$ wurde der Na-Ueberschuß nach 10 Min. beseitigt. Die entstandenen Lösungen waren jetzt farblos bis gelblich. Zur Abtrennung von den nicht in Lösung gegangenen Teilen wurde unter Feuchtigkeits- und Luftausschluß über ein Glasfilter filtriert. Die zur Umsetzung mit den entstandenen Na-Verbindungen notwendige Menge $NH_4Cl$ wurde nun eingetragen. Nach Zugabe von 50 ml Pyridin wurde bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß durch die anfänglich vorhandene Pyridin/fl.$NH_3$-Lösung und dann, nach Zugabe von 2 n Ammoniak, durch die wässrige Pyridin/Ammoniak-Lösung $CO_2$-freie Luft gesaugt, wobei langsam die Rotfärbung wiederkam. Mit Wasser wurde auf 150 ml aufgefüllt. Bei Zugabe von Eisessig fiel das gewünschte Produkt meist sofort bei $p_H$=5,2. Sonst wurde durch Zugabe von

konz. Ammonsulfat-Lösung gefällt. Nach dem Waschen mit Wasser wurde in Eisessig aufgenommen, mit Wasser verdünnt und mit Ammonacetatlösung bei $p_H$=4,2 gefällt. Es wurde dann noch einmal durch Lösen in 1 n Ammoniak und Ausfällen mit Eisessig gereinigt, auf der Zentrifuge gründlich gewaschen und dann getrocknet.

Nach diesem Verfahren wurden folgende Substanzen dargestellt:

1.3.5.8-Tetramethyl-2.4-diäthyl-6.7-bis(propionyl-L-histidin)-porphin

o d e r

Mesoporphyrin-IX-bis(L-histidin)

Ansatz: 0,360 g (0,3 mMol) Mesoporphyrin-IX-bis($N^{1(3)}$-bz-L-his-Obz)

Ausbeute: 0,101 g = 40 % der Theorie

F. schmilzt nicht bis 320°C

$C_{46}H_{52}O_6N_{10}$ MG: 840,96

1.3.5.8-Tetramethyl-2.4-diäthyl-6.7-bis-(propionyl-L-histidylglycylglycin)-porphin

o d e r

Mesoporphyrin-IX-bis(L-histidylglycylglycin)

Ansatz: 0,434 g (0,3 mMol) Mesoporphyrin-IX-bis (L-histidylglycylglycin)·$H_2O$

Ausbeute: 0,109 g = 34 % der Theorie

F. schmilzt nicht bis 320°C

$C_{54}H_{64}O_{10}N_{14}$ MG: 1069,16

Zur Analyse wurde bei 110°C i. Hv. getrocknet.

Berechnet: C 60,66 % H 6,03 % N 18,34 %
Gefunden: 60,63 % 6,37 % 18,41 %

2,5 % Rstd. bei der C/H-Best.; 1,5 % bei der N-Best.

1.3.5.8-Tetramethyl-2.4-diäthyl-6.7-bis-(propionyl-L-alanyl-L-histidylglycin)-porphin

o d e r

Mesoporphyrin-IX-bis(L-alanyl-L-histidylglycin)

Ansatz: 0,443 g (0,3 mMol) Mesoporphyrin-IX-bis(L-ala-$N^{1(3)}$-bz-L-his-Obz)·$H_2O$

Ausbeute: 0,104 g = 31,6 % der Theorie

F. schmilzt nicht bis 320°C

$C_{56}H_{68}O_{10}N_{14}$ MG: 1097,22

Zur Analyse wurde bei 110°C i. Hv. getrocknet

Berechnet: C 61,30 % H 6,25 %
Gefunden: 61,37 % 6,40 %

Verbrennungsrückstand = 0,8 % der Einwaage

1.3.5.8-Tetramethyl-2.4-diäthyl-6.7-bis-(propionyl-L-alanyl-glycyl-L-histidin)-Porphin

o d e r

Mesoporphyrin-IX-bis(L-alanylglycyl-L-histidin)

Ansatz: 0,443 g (0,3 mMol) Mesoporphyrin-IX-bis(L-ala-gly-$N^{1(3)}$-bz-L-his-Obz)·$H_2O$

Ausbeute: 0,098 g = 30 % der Theorie
F. schmilzt nicht bis 320°C

$C_{56}H_{68}O_{10}N_{14}$ MG: 1097,22

Zur Analyse wurde bei 110°C i. Hv. getrocknet.

Berechnet: C 61,30 % H 6,25 %
Gefunden: 61,42 % 6,59 %

Verbrennungsrückstand: 0,8 % der Einwaage

Vorschrift zur Darstellung der Eisen(III)komplexsalze histidinhaltiger Mesoporphyrin-IX-bis(peptide)

0,05 mMol der Mesoporphyrin-IX-bis(peptide) wurden in 1,5 ml 80 %iger Essigsäure in der Wärme gelöst. Nach der Zugabe einer in der Wärme gesättigten Lösung von Eisen(II)acetat in Eisessig, die nur 90 % der für die vollständige Komplexbildung notwendigen Menge an Eisen enthielt, wurde 3 Min. auf 80 bis 90°C erwärmt. Die Essigsäure wurde bei vermindertem Druck entfernt. Durch wiederholte Zugabe von 80 %iger Essigsäure und anschließendes Einengen bei gleichzeitigem Hindurchleiten eines kräftigen Luftstroms wurde die Komplexbildung vervollständigt. Anschließend wurde mit wenig Wasser versetzt, i.V. abgezogen und über Aetzkali getrocknet. Der Rückstand wurde in der Wärme mit Methanol extrahiert. Beim Einengen fielen die inneren Histidin-Hämichromogenkomplexe der eingesetzten Verbindungen aus.

Ausbeuten: 75 - 80 % der Theorie (bezogen auf die eingesetzte Eisenmenge)

Zur Bestimmung der Eisengehalte wurde bei 110°C i.V. getrocknet.

Inneres Hämichromogen des Mesohämin-IX-bis(L-histidin)

$C_{46}H_{49}O_6N_{10}Fe$ MG: 893,78

Berechnet: Fe 6,25 % Gefunden: Fe 6,46 %

Inneres Hämichromogen des Mesohämin-IX-bis(L-histidylglycylglycin)

$C_{54}H_{61}O_{10}N_{14}Fe$ MG: 1121,99

Berechnet: Fe 4,98 % Gefunden: Fe 5,27 %

Inneres Hämichromogen des Mesohämin-IX-bis(L-alanyl-L-histidylglycin)

$C_{56}H_{65}O_{10}N_{14}Fe$ MG: 1150,04

Berechnet: Fe 4,86 % Gefunden: Fe 4,72 %

Inneres Hämichromogen des Mesohämin-IX-bis(L-alanylglycyl-L-histidin)

$C_{56}H_{65}O_{10}N_{14}Fe$ MG: 1150,04

Berechnet: Fe 4,86 % Gefunden: Fe 5,17 %

1.3.5.8-Tetramethyl-2.4-diäthyl-6.7-bis(propionyl-$N^{1(3)}$-benzyl-L-histidin)-porphin

o d e r

Mesoporphyrin-IX-bis($N^{1(3)}$-benzyl-L-histidin)

0,525 g (0,5 mMol) Mesoporphyrin-IX-bis($N^{1(3)}$-bz-L-hisOCH$_3$) wurden durch schwaches Erwärmen in 50 ml eines Gemisches aus 8 Volumenteilen Methanol und 2 Teilen 20 %iger Kalilauge gelöst. Nach dem Verdünnen mit Wasser wurde mit Essigsäure gefällt. Nach dem Auswaschen des Niederschlages wurde in verdünntem Ammoniak aufgenommen, filtriert und durch Zugabe von Essigsäure erneut ausgefällt. Nach gründlichem Auswaschen wurde im Exsiccator über Schwefelsäure i.V. getrocknet.

Ausbeute: 0,402 g = 76 % der Theorie

F. 176 - 178°C (Kofler)

$C_{60}H_{64}O_6N_{10}.2H_2O$ MG: 1057,22

Zur Analyse wurde über $H_2SO_4$ i.V. getrocknet.

Berechnet: C 68,17 % H 6,48 % N 13,24 % (.2 $H_2O$)
Gefunden: 68,20 % 6,53 % 12,93 %

Eisen(III)komplexsalz des 1.3.5.8-Tetramethyl-2.4-diäthyl-6.7-bis(propionyl-$N^{1(3)}$-benzyl-L-histidin)-porphin

o d e r

Mesohämin-IX-bis($N^{1(3)}$-benzyl-L-histidin)

0,106 g (0,1 mMol) Mesoporphyrin-IX-bis-($N^{1(3)}$-bz-L-his-OH) wurden in 2 ml Eisessig in der Wärme gelöst. Nach Zugabe einer Spatelspitze Kochsalz wurde eine heiße Lösung von Ferroacetat in Eisessig, die 5 % mehr als die benötigte Menge Eisen enthielt, zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 5 Min. bei etwa 80°C gehalten, wobei gleichzeitig ein kräftiger Luftstrom durch die Lösung gesaugt wurde. Die rotviolette Lösungsfarbe des Porphinderivats ging dabei in braun über und das Hämin fiel aus. Auf der Zentrifuge wurde mit wenig kalter 10 %iger Essigsäure und dann mit wenig Wasser gewaschen.

Ausbeute: 0,072 g = 65 % der Theorie

$C_{60}H_{62}O_6N_{10}FeCl$ MG: 1110,48

Zur Bestimmung des Eisengehaltes wurde bei 110°C i.V. getrocknet.

Berechnet: Fe 5,03 % Gefunden: Fe 5,10 %

Eisen(III)komplexsalz des 1.3.5.8-Tetramethyl-2.4-diäthyl-6.7-bis(propionyl-L-alanylglycylglycin)-porphin

o d e r

Mesohämin-IX-bis(L-alanylglycylglycin)

0,099 g (0,1 mMol) Mesoporphyrin-IX-bis(L-ala-gly-gly-$OC_2H_5$) wurden in 1 ml ausgefrorenem Eisessig gelöst und mit 1 ml HBr-Eisessig (37 %ig) versetzt. In einer Glasbombe wurde 40 Min. auf 60°C erhitzt. Nach dem Kühlen in Eiswasser wurde in gekühlte ges. Ammonsulfatlösung eingegossen und durch Zugabe von konz. Ammoniak auf $p_H$ 4,4 eingestellt. Die ausgefallenen Reaktionsprodukte wurden auf der Zentrifuge solange mit Wasser gewaschen, bis das Waschwasser einen leicht rötlichen Schimmer zeigte. In 1 n Ammoniak wurde nun gelöst. Nach

der Filtration wurde mit Eisessig auf $p_H$ 5,6 eingestellt, worauf die freie Dicarbonsäure ausflockte. Nach dem Zentrifugieren konnte nur einmal mit wenig Wasser gewaschen werden, da sofort Substanz in Lösung ging. Nach dem Trocknen über $H_2SO_4$ i.V. verblieben 76 mg einer durch Salze verunreinigten Substanz, die in das Hämin überführt wurde.

Dazu wurde die Substanz in 2 ml Eisessig in der Wärme gelöst und mit einer Spatelspitze pulv. Kochsalzes versetzt. Eine heiße Lösung von Eisen(II)acetat in Eisessig, die 5 % mehr als die benötigte Menge an Eisen enthielt, wurde dazugegeben. Unter Hindurchleiten eines kräftigen Luftstroms wurde 3 Min. auf 80 - 90°C erwärmt. Der Eisessig wurde bei vermindertem Druck abgezogen. Nach erneuter Zugabe von Eisessig wurde nochmals eingeengt. Auf der Zentrifuge wurde mehrmals mit $\frac{n}{100}$ HCl und dann so lange mit Wasser gewaschen, bis sich das Waschwasser verfärbte.

Ausbeute: 0,063 g = 61 % der Theorie

$C_{48}H_{58}O_{10}N_{10}FeCl$ MG: 1026,33

Zur Bestimmung des Eisengehaltes wurde bei 110°C i.V. getrocknet.

Berechnet: Fe 5,45 % Gefunden: Fe 5,71 %

Eisen(III)komplexsalz des 1.3.5.8-Tetramethyl-2.4-diäthyl-6.7-bis(propionyl-L-alanylglycylglycyl-L-alanylglycylglycin)-porphin

o d e r

Mesohämin-IX-bis(L-alanylglycylglycyl-L-alanylglycylglycin)

0,136 g (0,1 mMol) Mesoporphyrin-IX-bis-[(L-ala-gly-gly)$_2$-$OC_2H_5$] wurden wie oben beschrieben mit HBr-Eisessig verseift. Da sich die Reaktionsprodukte nach dem Ausfällen und Waschen nicht in 1 n Ammoniak lösten, wurde mit einem Gemisch von Ammoniak/Pyridin (1:1) digeriert, wobei ein Teil der Substanz in Lösung ging. Im Scheidetrichter wurde mehrmals mit ges.

Ammonsulfatlösung gewaschen. Dann wurde die Pyridinschicht abgetrennt, filtriert und i.V. eingeengt. Das so erhaltene Produkt ging in 1 n Ammoniak in Lösung und fiel bei der Zugabe von Eisessig bei $p_H$ 5,6 aus. Die Substanz konnte nicht salzfrei gewaschen werden. Die Ausbeute betrug nur 22 mg.

Die Einführung des Eisens wurde, wie bei der entsprechenden Tripeptidverbindung beschrieben, vorgenommen.

Ausbeute: 0,014 g = 10 % der Theorie

$C_{62}H_{80}O_{16}N_{16}FeCl$ MG: 1396,70

Zur Eisenbestimmung wurde bei 110°C i.V. getrocknet.

Berechnet: Fe 4,0 % Gefunden: Fe 4,2 %

Die Eisenbestimmungen wurden mit α,α'-Dipyridyl auf kolorimetrischem Wege durchgeführt (36). Der Aufschluß der Substanzen erfolgte mit heißer konz. $H_2SO_4$ und $H_2O_2$ (37). Die Eichkurve wurde mit Mohr'schem Salz sowie mit Mesohämin-IX hergestellt.

Sämtliche dargestellten eisenfreien Porphin- und Phorbinderivate zeigen auch im festen Zustand die Farbe ihrer Stammsubstanzen. Die eisenhaltigen Verbindungen wurden als rotbraune bis dunkelbraune amorphe Pulver erhalten.

B. Peptide

Ausgangssubstanzen

Das für die Synthesen benötigte L-Alanin wurde aus Rohseide nach E. FISCHER (38) oder durch enzymatische Spaltung von Benzoyl-DL-alanin nach D.G. DOHERTY u. E.A. POPENOE jr. (39) erhalten. Das benötigte L-Histidin wurde nach G.L. FOSTER und D. SHEMIN (40) aus Rinderblut isoliert. Die Ausgangsaminosäuren sowie die nach bekannten, hier nicht aufgenommenen, Vorschriften dargestellten Aminosäure - bzw. Peptidderivate zeigten die in der Literatur angegebenen Schmelzpunkte und spez. Drehungen.

$N^{\alpha}$-Carbobenzoxy-L-alanylglycylglycinäthylester

Nach gründlichem Trocknen der Ausgangssubstanzen wurden unter Feuchtigkeitsausschluß 19,6 g (0,1 Mol) Diglycinäthylesterhydrochlorid (41) in 80 ml wasserfreiem Pyridin aufgeschlämmt. Es wurde in Eiswasser auf 0°C abgekühlt und tropfenweise mit einer Lösung von 4,4 ml (0,05 Mole) Phosphortrichlorid (über Dimethylanilin dest.) in 60 ml abs. Pyridin versetzt. Nach 45 Min. Stehen bei Raumtemperatur wurden 22,3 g (0,1 Mol) $N^{\alpha}$-Carbobenzoxy-L-alanin (17), gelöst in 30 ml abs. Pyridin, dazugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 Stunden auf dem siedenden Wasserbad erhitzt, das Pyridin dann im Vakuum abgezogen und der Rückstand, ein rötliches, hochviskoses Oel, durch Schütteln mit Essigester, dem etwas Wasser zugesetzt war, in Lösung gebracht. Die Essigestermenge wurde auf 1500 ml erhöht. Es wurde dreimal mit 0,5 n HCl, einmal mit Wasser, dreimal mit Sodalösung (10%ig) und dann wieder zweimal mit Wasser gewaschen (jeweils 250 ml). Die leicht gelbgefärbte Lösung wurde nun mit wasserfreiem

$Na_2SO_4$ getrocknet, wobei gleichzeitig Aktivkohle zur Entfärbung zugesetzt wurde. Beim Einengen nach Filtration fiel das Endprodukt aus. Durch Zusatz von Petroläther wurde die Fällung vervollständigt. Es wurde aus der 8-fachen Menge Essigester umkristallisiert. Farblose Nadeln.
Ausbeute: 23,7 g = 65 % der Theorie

F. 135 - 136°C

$[\alpha]_D^{23}$ = -5,9° ± 1° (c = 2 in Eisessig)

$C_{17}H_{23}O_6N_3$ MG: 365,38

Zur Analyse wurde bei 75°C i.V. getrocknet

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Berechnet: | C | 55,88 % | H | 6,35 % | N | 11,50 % | $OC_2H_5$ | 12,33 % |
| Gefunden: | | 56,00 % | | 6,51 % | | 11,39 % | | 12,15 % |

$N^{\alpha}$-Carbobenzoxy-DL-alanylglycylglycinäthylester

Die Darstellung erfolgte unter Verwendung von $N^{\alpha}$-Carbobenzoxy-DL-alanin (17) wie es bei der optisch aktiven Verbindung beschrieben wurde. Zum Ausschütteln wurde jedoch nur auf 1000 ml Essigesterlösung aufgefüllt, da Cbo-DL-ala-gly-gly-$OC_2H_5$ leichter in Essigester löslich ist. Es wurde aus der 4-fachen Menge Tetrahydrofuran umkristallisiert. Farblose Nadeln.
Ausbeute: 21,9 g = 60 % der Theorie

F. 112 - 115°C

Zur Analyse wurde bei 75° i.V. getrocknet

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Berechnet: | C | 55,88 % | H | 6,35 % | N | 11,50 % | $OC_2H_5$ | 12,33 % |
| Gefunden: | | 55,41 % | | 5,85 % | | 11,50 % | | 12,45 % |

L-Alanylglycylglycinäthylesterhydrobromid

9,13 g (0.025 Mole) $N^{\alpha}$-Carbobenzoxy-L-alanylglycylglycinäthylester wurden in 12,5 ml ausgefrorenem Eisessig aufgeschlämmt und mit 12,5 ml 37 %iger HBr/Eisessig-Lösung bei Raumtemperatur versetzt. Bald danach trat Lösung ein unter $CO_2$-Entwicklung.

Nach 45 Min. Stehen unter Feuchtigkeitsausschluß, wobei häufig umgeschüttelt wurde, war die $CO_2$-Entwicklung beendet. Es wurden nun unter Schütteln 250 ml abs. Aethers dazugegeben, wobei ein zähflüssiger Sirup ausfiel.

Die noch trübe Aetherschicht wurde abgegossen. Durch leichtes Erwärmen unter Feuchtigkeitsausschluß wurde in 15 ml abs. Aethanol gelöst. Nach vollständigem Lösen begann bald das Ausfallen des kristallinen Hydrobromids.

Die Fällung wurde durch Zugabe von 200 ml abs. Aether vervollständigt. Es wurde abgesaugt und mit abs. Aether gewaschen. Umkristallisiert wurde aus 15 ml Aethanol. Farblose Prismen.

Ausbeute: 6,6 g = 84 % der Theorie

F. 173 - 174°C

$[\alpha]_D^{25}$ = +13,2° ± 1° (c = 2 in Methanol)

$C_9H_{18}O_4N_3Br$ MG: 312,17

Zur Analyse wurde bei 75°C i.V. getrocknet

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Berechnet: | C 34,62 % | H 5,82 % | N 13,46 % | Br 25,60 % |
| Gefunden: | 34,77 % | 5,75 % | 13,26 % | 25,62 % |

$N^{\alpha}$-Carbobenzoxy-L-alanylglycylglycinhydrazid

9,1 g (= 0,025 Mole) $N^{\alpha}$-Carbobenzoxy-L-alanylglycylglycinäthylester wurden durch Erwärmen auf dem Wasserbad in 40 ml

abs. Aethanol gelöst. 3 ml (0,062 Mole) Hydrazinhydrat wurden dazugegeben. Während einstündigen Kochens fiel das Hydrazid aus. Nach 20stündigem Stehen bei Raumtemperatur wurde abgesaugt und mit Aethanol gewaschen. Es wurde aus der 7-fachen Menge 50 %igen Aethanols umkristallisiert. Farblose Nadeln.
Ausbeute: 7,75 g = 88 % der Theorie

F. 195 - 196°C

$[\alpha]_D^{25} = -9{,}51° \pm 1°$ (c = 2 in Eisessig)

$C_{15}H_{21}O_5N_5$ MG: 351,36

Zur Analyse wurde über $H_2SO_4$ i.V. getrocknet

| | | | |
|---|---|---|---|
| Berechnet: | C 51,27 % | H 6,02 % | N 19,93 % |
| Gefunden: | 51,24 % | 5,99 % | 20,00 % |

$N^{\alpha}$-Carbobenzoxy-DL-alanylglycylglycinhydrazid

Darstellung aus $N^{\alpha}$-Carbobenzoxy-DL-alanylglycylglycinäthylester wie bei der optisch aktiven Verbindung beschrieben. Die Umkristallisation erfolgte aus der 10-fachen Menge 50 %igen Aethanols. Farblose Nadeln.
Ausbeute: 7,75 g = 88 % der Theorie

F. 202 - 205°C

Zur Analyse wurde über $H_2SO_4$ i.V. getrocknet

| | | | |
|---|---|---|---|
| Berechnet: | C 51,27 % | H 6,02 % | N 19,93 % |
| Gefunden: | 51,33 % | 6,28 % | 19,87 % |

$N^{\alpha}$-Carbobenzoxy-L-alanylglycylglycin

1,83 g (= 0,005 Mole) $N^{\alpha}$-Carbobenzoxy-L-alanylglycylglycinäthylester wurden in 16 ml Dioxan/Wasser (5:1) gelöst. Die Lösung wurde in Portionen von 0,2 ml mit 25 ml 0,2 n

NaOH (0,005 Val.) bei Raumtemperatur versetzt. Erneute Zugabe erfolgte erst nach der Entfärbung des zugesetzten Indikators Thymolphthalein.

Nach Beendigung der Verseifung wurden mit 5 ml 1 n HCl die Carboxylgruppen frei gemacht. Nach dem Einengen im Vakuum wurde zweimal aus wenig Wasser umkristallisiert. Farblose Nadeln.
Ausbeute: 1,3 g = 79 % der Theorie

F. 156-157,5°C

$[\alpha]_D^{25} = -7,6° \pm 1°$ (c = 2 in Methanol)

$C_{15}H_{19}O_6N_3$ MG: 337,33

Zur Analyse wurde über $H_2SO_4$ i.V. getrocknet

| | | | |
|---|---|---|---|
| Berechnet: | C 53,41 % | H 5,68 % | N 12,46 % |
| Gefunden: | 53,39 % | 5,68 % | 12,51 % |

Die Verbindung wurde auch dargestellt durch Reaktion des gemischten Anhydrids aus $N^{\alpha}$-Carbobenzoxy-L-alanin und Kohlensäureäthylester mit Diglycinhydrochloridhydrat (42) nach der von G. SCHRAMM und H. RESTLE (43) für die racemische Verbindung gegebenen Vorschrift.

L-Alanylglycylglycin

I) 1,83 g (0,005 Mole) $N^{\alpha}$-Carbobenzoxy-L-alanylglycylglycinäthylester wurden in 3,5 ml ausgefrorenem Eisessig aufgeschlämmt und anschließend mit 3,5 ml 37 %iger HBr/Eisessig-Lösung versetzt. Es wurde 10 Min. auf 60°C erwärmt. Die Reaktionsprodukte wurden mit trockenem Aether gefällt und bis zur Verfestigunggerührt, wobei der Aether mehrere Male erneuert wurde. Nach dem Trocknen wurde in 10 ml 2 n Ammoniak aufgenommen, Unlösliches abfiltriert und auf dem Wasserbad im Vakuum bis zur öligen Konsistenz eingeengt.

Das Oel wurde in möglichst wenig warmem Wasser gelöst. Dann wurde mit Aethanol bis zur beginnenden Trübung versetzt. Das Tripeptid kristallisierte. Es wurde nochmals umkristallisiert. Farblose Nadeln.

Ausbeute: 620 mg = 62 % der Theorie

F. 218°C

$[\alpha]_D^{23}$ = +31,0 ± 1° (c = 10 in Wasser)

$C_7H_{13}O_4N_3$ MG: 203,20

II) 3,12 g (0,01 Mol) L-Alanylglycylglycinäthylesterhydrobromid wurden in 65,8 ml 0,319 n $Ba(OH)_2$ (0,021 Val.) bei Raumtemperatur gelöst. Nach 20 Min. wurden 52,49 ml 0,4 n $H_2SO_4$ (0,021 Val.) dazugegeben und das entstandene $BaSO_4$ abzentrifugiert. Nach Zugabe von 10 ml Ammoniak wurde wie unter I) beschrieben weitergearbeitet.

Ausbeute: 1,73 g = 85 % der Theorie.

Das nach I) und II) erhaltene Tripeptid stimmte im Schmelzpunkt und in der Drehung mit dem Produkt überein, das von J. L. BAILEY (44) durch Verseifung des durch Reaktion von L-Alanin-N-carboxyanhydrid mit Glycylglycinäthylester entstandenen freien Esters erhalten wurde.

<u>$N^{\alpha}$-Carbobenzoxy-L-alanylglycylglycyl-L-alanylglycylglycinäthylester</u>

I) 3,12 g (0,01 Mol) L-Alanylglycylglycinäthylesterhydrobromid wurden in 8 ml absolutem Pyridin gelöst und nach Kühlung auf 0°C tropfenweise mit einer Lösung von 0,44 ml (0,005 Mole) Phosphortrichlorid in 6 ml absolutem Pyridin versetzt. Nach 45 Min. Stehen bei Raumtemperatur wurden 2,7 g (0,008 Mole) $N^{\alpha}$-Carbobenzoxy-L-alanylglycylglycin in 6 ml absolutem Pyridin hinzugegeben. Nach 3-stündigem

Erhitzen auf 50°C und 12-stündigem Stehen bei Raumtemperatur wurde das Pyridin zu 3/4 im Vakuum abgezogen. Nach Zugabe von Natriumbikarbonatlösung fiel das Hexapeptidderivat aus. Umkristallisation aus 50 %igem Aethanol unter Zusatz von Aktivkohle. Kugelige Aggregate ohne deutliche Kristallform.

Ausbeute: 2,0 g = 45 % der Theorie

F. 189-190°C

$[\alpha]_D^{21} = -14{,}0° \pm 1°$ (c = 2 in Eisessig)

$C_{24}H_{34}O_9N_6$ MG: 550,56

Zur Analyse wurde bei 75°C im Vakuum getrocknet.

| | | | |
|---|---|---|---|
| Berechnet: | C 52,35 % | H 6,22 % | N 15,27 % |
| Gefunden: | 52,29 % | 5,97 % | 15,23 % |

II) 8,75 g (0,025 Mole) $N^{\alpha}$-Carbobenzoxy-L-alanylglycylglycinhydrazid wurden in 35 ml Eisessig unter Zusatz von 10 ml 5 n HCl gelöst. Nach Zugabe von 20 ml $H_2O$ wurde auf -15°C abgekühlt und mit einer konzentrierten Lösung von 1,9 g $NaNO_2$ in Wasser (0,0275 Mole) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 3 Min. auf -5°C gehalten. Danach wurde nach Zugabe von 100 ml Wasser mit 300 ml Essigester (alles auf 0°C vorgekühlt) versetzt und das Azid extrahiert.

Die Essigesterlösung des Azids wurde unter Kühlung einmal mit Wasser und dann solange mit 3 %iger $NaHCO_3$-Lösung gewaschen, bis diese nicht mehr verbraucht wurde. Dann wurde nochmals mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde bei 0°C mit $Na_2SO_4$ getrocknet.

Gleichzeitig wurde eine Lösung von 9,35 g (0,03 Mole) L-Alanylglycylglycinäthylesterhydrobromid in 35 ml Methanol hergestellt, die mit 4,85 ml (0,035 Mole) Triäthylamin versetzt wurde. In diese gekühlte Lösung wurde die oben erhaltene

filtrierte Azidlösung mit einem Male eingegossen. Das Reaktionsgemisch wurde 100 Stunden bei +4°C und 24 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt. Das als gallertige Masse ausgefallene Produkt wurde abgesaugt, mit Essigester und Methanol gewaschen und getrocknet. Umkristallisation aus 50 %igem Aethanol. Kugelige Aggregate ohne deutliche Kristallform.

Ausbeute: 8,5 g = 62 % der Theorie

F. 189-190°C

$[\alpha]_D^{25} = -15{,}0° \pm 1°$ (c = 2 in Eisessig)

N$^{\alpha}$-Carbobenzoxy-DL-alanylglycylglycyl-DL-alanylglycylglycinmethylester

Darstellung nach der Azidmethode wie für den optisch aktiven Aethylester beschrieben durch Kupplung von N$^{\alpha}$-Carbobenzoxy-DL-alanylglycylglycinhydrazid mit DL-Alanylglycylglycinmethylesterhydrochlorid (35). Kugelige Aggregate ohne deutliche Kristallform.

Ausbeute: 60 % der Theorie

F. 216°C

$C_{23}H_{32}O_9N_6$ MG: 536,53

Zur Analyse wurde bei 75°C im Vakuum getrocknet.

| | | | |
|---|---|---|---|
| Berechnet: | C 51,48 % | H 6,01 % | N 15,66 % |
| Gefunden: | 51,58 % | 5,73 % | 15,61 % |

L-Alanylglycylglycyl-L-alanylglycylglycinäthylesterhydrochlorid

I) 2,75 g (0,005 Mole) Cbo-hexapeptidester wurden zu dem in 10 ml bidest. Wasser aufhydrierten Bariumsulfat-Palladiumoxydhydrat-Katalysator (14) (2 g) gegeben und nach Zusatz von 40 ml Eisessig unter Kontrolle der $CO_2$-Entwicklung hydriert. Theoretische $CO_2$-Entwicklung = 220 mg; praktische $CO_2$-Entwicklung nach 1 Stunde = 219 mg. Der Katalysator-

schlamm wurde abfiltriert und mit Aethanol gewaschen. Die vereinigten Lösungen wurden bei Raumtemperatur im Vakuum bis zur Trockne eingeengt. Es wurde noch dreimal nach Zugabe von Aethanol abgezogen, wobei sich zuletzt der anfänglich als Oel vorliegende freie Hexapeptidester verfestigte. In Aethanol wurde aufgeschlämmt und etwas mehr als die zur Bildung des Hydrochlorids notwendige Menge äthanolische Salzsäure zugegeben, wobei erst alles in Lösung ging und dann das Hydrochlorid ausfiel. Umkristallisiert wurde aus viel Aethanol. Kugelige Aggregate ohne deutliche Kristallform.

Ausbeute: 1,81 g = 80 % der Theorie

F. 207-208°C (Z)

$[\alpha]_D^{19} = -3,5° \pm 1°$ (c = 2 in Methanol)

$C_{16}H_{29}O_7N_6Cl$ MG: 452,90

Zur Analyse wurde bei 75°C im Vakuum getrocknet.

| | |
|---|---|
| Berechnet: | Cl 7,83 % |
| Gefunden: | 7,80 % |

II) 2,75 g (0,005 Mole) $N^{\alpha}$-Carbobenzoxy-hexapeptidester wurden in 2,5 ml trocknem Eisessig aufgeschlämmt und mit 2,5 ml 37 %iger HBr-Eisessig-Lösung bei Raumtemperatur versetzt. Bei dauerndem Schütteln trat bald Lösung ein. Nach 60 Min. wurden die Reaktionsprodukte mit abs. Aether gefällt. Die hochviskose Masse wurde mehrmals mit Aether gewaschen. Nach kurzem Trocknen wurde in abs. Aethanol aufgenommen und über Nacht stehen gelassen. Ein Rückstand wurde abfiltriert (1,3 g) und wieder zum Ausgangsprodukt aufgearbeitet.

Aus der alkoholischen Lösung fiel das Hydrobromid mit Aether in flockiger Form aus. Es wurde nochmals wie beschrieben umgefällt. Stark hygroskopische, amorphe Masse ohne definierten Schmelzpunkt.

Ausbeute: 1,04 g = 77 % der Theorie (bezogen auf 2,75 - 1,30 = 1,45 g Ausgangsprodukt)

Durch Einleiten von gasförmiger Salzsäure in eine äthanolische Lösung des Hydrobromids wurde das Hydrochlorid erhalten.

$N^{\alpha}$-Carbobenzoxy-L-alanylglycylglycyl-L-alanylglycylglycin

2,75 g (0,005 Mole) des Cbo-hexapeptidesters wurden in 40 ml Dioxan/Wasser (5:1) unter leichtem Erwärmen gelöst. Die Lösung wurde bei 20°C in Portionen von 0,2 ml mit 25 ml 0,2 n NaOH in Gegenwart von Thymolphthalein als Indikator versetzt. Nach Beendigung der Verseifung wurde die äquivalente Menge 1 n HCl + 5 ml hinzugegeben. Dann wurde im Vakuum zur Trockne eingeengt. Das erhaltene Gemisch wurde in der Siedehitze in möglichst wenig Wasser gelöst und filtriert. Beim Erkalten fiel das gewünschte Produkt aus. Dieses Reinigungsverfahren wurde wiederholt. Keine deutliche Kristallform.

Ausbeute: 1,3 g = 49 % der Theorie

F. 166-175°C (Z)

$[\alpha]_D^{19}$ = - 15,5° ± 1° (c = 2 in Eisessig)

$C_{22}H_{30}O_9N_6 \cdot \frac{1}{2} H_2O$ MG: 531,52

Zur Analyse wurde über $H_2SO_4$ im Vakuum getrocknet.

| | | | |
|---|---|---|---|
| Berechnet. | C 49,71 % | H 5,87 % | N 15,81 % (. $\frac{1}{2} H_2O$) |
| Gefunden: | 49,66 % | 5,69 % | 15,75 % |

L-Alanylglycylglycyl-L-alanylglycylglycin

I) 1,13 g (0,0025 Mole) des Hexapeptidätylesterhydrochlorids wurden in 18,31 ml 0,3003 n Bariumhydroxydlösung (0,0055 Val) gelöst und bei Raumtemperatur 40 Min. stehen gelassen. Dann wurden 11 ml 0,5 n Schwefelsäure (0,0055 Val) dazugegeben. Das Bariumsulfat wurde abfiltriert und mit heißem Wasser ausgewaschen. Nach Zugabe von 5 ml 1 n Ammoniak zu den vereinigten

Filtraten wurde im Vakuum bis zur Trockne abgezogen. Dann wurde in wenig warmem Wasser gelöst und mit Aethanol bis zur beginnenden Trübung versetzt. Das Hexapeptid fiel aus. Die Umfällungen wurden solange wiederholt, bis Chlorionen in der Mutterlauge nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Kugelige Aggregate ohne deutliche Kristallform.

Ausbeute: 0,480 g = 49,5 % der Theorie

Zur Bestimmung der physikalischen Konstanten wurde bei 110°C im Vakuum getrocknet.

F. 212°C (Z) Braunfärbung ab 190°C

$[\alpha]_D^{25} = -13{,}7° \pm 1°$ (c = 4 in Wasser)

$C_{14}H_{24}O_7N_6$ MG: 388,38

II) 1,33 g (0,0025 Mole) Cbo-hexapeptid . $\frac{1}{2}$ $H_2O$ wurden zu dem in 10 ml bidest. Wasser aufhydrierten Bariumsulfat-Palladiumoxydhydrat-Katalysator (1 g) gegeben und nach Zusatz von 40 ml Dimethylformamid unter Kontrolle der $CO_2$-Entwicklung hydriert. Nach dem Abfiltrieren des Katalysatorschlamms und nach dem Waschen des Rückstandes mit Wasser wurden die vereinigten Filtrate im Vakuum zur Trockne abgezogen. Aus Wasser/Aethanol wurde umkristallisiert.

Ausbeute: 0,601 g = 62 % der Theorie

III) Die Verbindung wurde auch durch Behandlung des Cbo-hexapeptidesters mit HBr-Eisessig erhalten. Es wurde in 18 %igem HBr-Eisessig 20 Min. auf 60°C erwärmt. Die Aufarbeitung erfolgte so wie beim L-Alanylglycylglycin.

Ausbeute: 58 % der Theorie

Das nach I), II) und III) erhaltene L-Hexapeptid stimmte im Schmelzpunkt und im Absolutwert der Drehung mit der von E. FISCHER (45) nach anderen Methoden dargestellten D-Verbin-

dung überein. Die von ihm angegebenen Werte liegen etwas niedriger:

F. 207°C (Z) $[\alpha]_D^{22} = +13{,}2°$ (c=8 in Wasser)

$N^{1(\pi)}$Benzyl-L-histidinbenzylester-di-p-toluolsulfonat

12,26 g (0,05 Mole) $N^{1(\pi)}$Benzyl-L-histidin (20) wurden in 45 ml Benzylalkohol gelöst. Nach Zugabe von 22 g p-Toluolsulfonsäure.$H_2O$ wurden 100 ml Tetrachlorkohlenstoff zugesetzt. Vom Wasserbade aus wurde der Tetrachlorkohlenstoff im Verlaufe mehrerer Stunden abdestilliert (46). $CCl_4$ wurde so oft zugesetzt und abdestilliert, bis kein Wasser mehr mit überging. Mit Aether wurden die Reaktionsprodukte ausgefällt. Aus Methanol/Essigester kristallisierte die Substanz in farblosen Nadeln.

Ausbeute: 23,5 g = 80 % der Theorie

F. 182-184°C

$[\alpha]_D^{23} = +9{,}4° \pm 1°$ (c = 2 in Methanol)

$C_{34}H_{37}O_8N_3S_2$ MG = 679,79

Zur Analyse wurde über $H_2SO_4$ im Vakuum getrocknet.

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Berechnet: | C | 60,07 % | H | 5,48 % | N | 6,18 % | S | 9,43 % |
| Gefunden: | | 60,01 % | | 5,55 % | | 6,13 % | | 9,74 % |

Carbobenzoxy-L-alanyl-$N^{1(\pi)}$benzyl-L-histidinbenzylester

6,80 g (0,01 Mol) $N^{1(\pi)}$Benzyl-L-histidinbenzylester.2 Tos. wurden in 8 ml abs. Pyridin gelöst und nach Kuhlung auf 0°C mit 0,437 ml (0,005 Mole) Phosphortrichlorid, gelöst in 7 ml abs. Pyridin, tropfenweise versetzt. Eine Stunde wurde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wurden 2,23 g (0,01 Mol) Cbo-L-alanin, gelöst in 10 ml abs. Pyridin, hinzugefügt. Unter Feuchtigkeitsausschluß wurde 3 Stunden auf 60°C erwärmt. Nach Stehen über Nacht bei Raumtemperatur wurde das Pyridin im

Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 400 ml Chloroform aufgenommen und jeweils mehrmals mit 0,5 n HCl, Wasser, 1o %-iger Sodalösung und wieder mit Wasser gewaschen. Bei gleichzeitigem Zusatz von Aktivkohle wurde über $CaCl_2$ getrocknet. Nach Filtration und Abziehen im Vakuum wurde der Rückstand aus Methanol umkristallisiert. Farblose Nadeln, die Methanol stark zurückhalten.

Ausbeute: 2,9 g = 54 % der Theorie

F . 135-136°C

$[\alpha]_D^{21} = -20,0° \pm 1°$ (c = 2 in Methanol)

$C_{31}H_{32}O_5N_4$ MG: 540,60

Zur Analyse wurde erst bei 40°C und dann bei 75°C im Vakuum getrocknet.

| | | | |
|---|---|---|---|
| Berechnet: | C 68,87 % | H 5,97 % | N 10,37 % |
| Gefunden: | 68,84 % | 5,72 % | 10,62 % |

L-Alanyl-L-histidin.$H_2SO_4$

1,081 g (0,002 Mole) Cbo-L-ala-$N^{1(3)}$bz-L-his-Obz wurden in 100 ml fl. Ammoniak aufgeschlämmt und mit einer Lösung von Natrium in fl. Ammoniak bis zur bleibenden Blaufärbung titriert. Nach Zusatz von Ammoniumjodid wurde das Ammoniak verdampft und völlig ausgetrieben. Der Rückstand wurde unter Aethanol stehen gelassen, wobei er nach längerem Stehen in Nadeln kristallisierte. Dieses Produkt wurde isoliert, mit Aethanol gut ausgewaschen und in 2 ml 2 n $H_2SO_4$ (0,004 Val) gelöst. Nach Zusatz von Aethanol kristallisierte das gewünschte Peptidsalz in Nadeln aus.

Ausbeute: 0,48 g = 74 % der Theorie
F . 183°C

$[\alpha]_D^{20} = +14,1° \pm 1°$ (c = 1 in Wasser)

$C_9H_{16}O_7N_4S$ MG: 324,31

Die physikalischen Konstanten stimmen mit den Werten von M. HUNT und V. du VIGNEAUD (12) überein, die diese Verbindung durch Kupplung von Cbo-L-alanin mit L-Histidinmethylester nach der Säurechloridmethode, Verseifung, Abspaltung der Cbo-Gruppe durch Hydrierung usw. erhielten.

Die für die Synthese der histidin-haltigen Fermentmodelle benötigten Tripeptidderivate

H-$N^{1(3)}$bz-L-his-gly-gly-Obz.2 HCl

H-L-ala-$N^{1(3)}$bz-L-his-gly-Obz.2 HCl

H-L-ala-gly-$N^{1(3)}$bz-L-his-Obz.2 HCl

und die entsprechenden Vorstufen wurden zusammen mit P. ZSCHENDERLEIN † (47) dargestellt. Eine Veröffentlichung der Arbeitsvorschriften erfolgt aus diesem Grunde an anderer Stelle.

C. Ausführung der katalytischen Messungen

Die Messungen des Sauerstoffverbrauchs wurden nach der manometrischen Methode (26) in der Warburg-Apparatur bei 30°C in Gegenwart von Luftsauerstoff durchgeführt. Jedes kegelförmige Reaktionsgefäß mit birnenförmigem Ansatz enthielt 5 ml Flüssigkeit. Die Gefäße einer Meßreihe wurden wie folgt beschickt:

1. 4,5 ml Puffer + 0,5 ml aqua bidest. (Thermobarometer)
2. 4,5 ml Puffer + 0,5 ml Substrat-Lösung ($10^{-4}$ Mol)
3. 3,5 ml Puffer + 1 ml Aminosäure- bzw. Peptidlösung; ($2 \cdot 10^{-7}$ Mole) + 0,5 ml Substrat-Lösung ($10^{-4}$ Mol)
4. 3,5 ml Puffer + 1 ml $Fe^{+++}$-Lösung ($10^{-7}$ Mol) + 0,5 ml Substrat-Lösung ($10^{-4}$ Mol)
5. 3,5 ml Puffer + 1 ml Mesohämin-IX-Lösung ($10^{-7}$ Mol) + 0,5 ml Substrat-Lösung ($10^{-4}$ Mol)
6. 2,5 ml Puffer + 1 ml Mesohämin-IX-Lösung ($10^{-7}$ Mol) + 1 ml Aminosäure- bzw. Peptidlösung ($2 \cdot 10^{-7}$ Mole) + 0,5 ml Substrat-Lösung ($10^{-4}$ Mol)
7. 3,5 ml Puffer + 1 ml Modell-Lösung ($10^{-7}$ Mol) + 0,5 ml Substrat-Lösung ($10^{-4}$ Mol)

Die Substratlösungen wurden jeweils kurz vor Beginn der Messungen hergestellt. Brenzcatechin wurde in bidest.Wasser gelöst. p-Phenylendiamin wurde als Dihydrochlorid eingewogen, in bidest. Wasser gelöst und durch Zugabe der berechneten Menge Natronlauge freigemacht.

Alle anderen Substanzen wurden in den entsprechenden 1/15 molaren Phosphatpuffern gelöst. Um Mesohämin-IX und die Mo-

dellsubstanzen in Lösung zu bekommen, mußte erst in der basischen Standardlösung gelöst werden. Durch Zugabe eines entsprechenden Anteils der sauren Standardlösung wurde dann der gewünschte $p_H$-Wert eingestellt.

Nach dem Beschicken der Gefäße – die Substratlösung befand sich zu Beginn jeder Messung in den birnenförmigen Ansätzen – wurde ohne Schütteln 5 Minuten im Thermostatenbad vorgewärmt. Dann wurden die Lösungen vereinigt, wobei gleichzeitig die jetzt angewärmten Schliffverbindungen an den Reaktionsgefäßen bis zum festen Kontakt eingedreht wurden. Unter Schütteln wurde der Temperaturausgleich noch 10 Minuten fortgesetzt. Dann wurde die Manometerflüssigkeit bei allen Manometern auf das gleiche Niveau (150 mm) eingestellt und die Verbindung der Reaktionsgefäße mit der Außenluft unterbunden. Die Ablesung der Manometer erfolgte bei konstanten Volumen der Reaktionsräume alle 10 Minuten. 8 Minuten wurde geschüttelt; 2 Minuten wurden für die stets in der gleichen Reihenfolge erfolgende Ablesung der Druckänderungen eines Meßansatzes (= 2 Meßreihen = 14 Gefäß-Manometer-Paare) benötigt.

Geschüttelt wurde mit 90 vollen Schwingungen pro Minute. Nur bei Ansätzen, die einen Sauerstoffverbrauch über 100 Kubikmillimeter pro Stunde zeigten, wurde die Schüttelgeschwindigkeit auf 160 Schwingungen erhöht.

Die Berechnung des Sauerstoffverbrauchs erfolgte nach

$$x = \frac{T_0}{T \cdot P_0} \cdot Vg \cdot h = 0{,}90106 \cdot 10^{-4} \cdot Vg \cdot h$$

worin

x = Menge des verbrauchten Sauerstoffs bei 0°C und 760 mm Hg in Kubikmillimetern

$T_0$ = 273,2°K

T = absolute Temperatur des Versuchs = 303,2°K

$P_0$ = Druck einer Atmosphäre, ausgedrückt in Millimeter - Manometerflüssigkeit (1 Atm = 10000 mm Brodiescher Lösung)

Vg = Volumen des Gasraumes in Kubikmillimetern

h = Durch das Thermobarometer korrigierte Druckänderung im Reaktionsgefäß, ausgedrückt in Millimeter-Manometerflüssigkeit.

Die Aenderung der Sauerstoffverteilung zwischen der Gasphase und der flüssigen Phase mit der Aenderung des Druckes im Reaktionsraum wurde bei den Berechnungen nicht berücksichtigt, da die entsprechenden Bunsenschen Absorptionskoeffizienten sehr klein sind.

## IV. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden die Synthesen, die optischen und chemischen Eigenschaften sowie die katalytischen Wirkungen der Eisenkomplexsalze einiger porphyrinsubstituierter Peptide beschrieben.

Zur peptidartigen Verknüpfung der Propionsäuregruppen einiger Porphin- und Phorbinderivate mit Peptidestern erwies sich die Aktivierung der Peptid-Aminoendgruppen nach der Phosphorazomethode geeignet. In histidin-haltigen Peptidestern wurde dazu der Imino-Wasserstoff im Imidazolring durch die Benzyl-Gruppe ersetzt.

Nach Abspaltung der Schutzgruppen und nach Einführung von Eisen wurden die Verbindungen

1) Mesohämin-IX-bis-($N^{1(3)}$-bz-L-his-OH)
2) Mesohämin-IX-bis-(L-ala-gly-gly-OH)
3) Mesohämin-IX-bis-[$(L\text{-ala-gly-gly})_2$-OH]

und die als innere Hämichromogene vorliegenden Verbindungen

4) Mesohämin-IX-bis-(L-his-OH)
5) Mesohämin-IX-bis-(L-his-gly-gly-OH)
6) Mesohämin-IX-bis-(L-ala-L-his-gly-OH)
7) Mesohämin-IX-bis-(L-ala-gly-L-his-OH)

auf ihre Oxydase-Eigenschaften untersucht.

Die Verbindungen 1-3 katalysieren die Dehydrierung von p-Phenylendiamin in Phosphatpuffer stark bei $p_H$=6,4, während bei $p_H$=8,2 die Wirkungen nur wenig höher sind als die Wirkung des reinen Mesohämin-IX. Eine Abhängigkeit von der Peptidkettenlänge ist vorhanden. Gegenüber Brenzcatechin zeigen sich keine besonderen Wirkungen.

Die Verbindungen 4–7 katalysieren die Dehydrierung des p-Phenylendiamin schwächer als Mesohämin-IX. Mit Brenzcatechin als Substrat zeigen sie bei $p_H$=8,1 eine wesentlich stärkere katalytische Wirkung. Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß hierbei der Elektronenübergang vom Substrat über den Imidazolring zum Eisen erfolgt.

## V. Literaturverzeichnis


| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. | WARBURG, O. | Z.physiol.Chem. | 66 | 305 | (1910) |
| | | " | 92 | 231 | (1914) |
| | | "Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten" | | Berlin 1948 | |
| 2. | WILLSTAETTER, R. | Ber. | 55 | 3606 | (1922) |
| | WILLSTAETTER, R. GRASER, J. KUHN, R. | Z.physiol.Chem. | 123 | 1 | (1922) |
| | WILLSTAETTER, R. SCHNEIDER, K. WENZEL, E. | Z.physiol.Chem. | 151 | 7 | (1926) |
| 3. | EULER, H. v. JOSEPHSON, K. | Z.physiol.Chem. | 133 | 295 | (1923/24) |
| | EULER, H. v. | Z.physiol.Chem. | 143 | 79 | (1925) |
| 4. | LANGENBECK, W. | Erg.Enzymforsch. | 2 | 314 | (1933) |
| | | "Die organischen Katalysatoren und ihre Beziehungen zu den Fermenten" | | Berlin 1949 | |
| | MIX, H. LANGENBECK, W. | Erg.Enzymforsch. | 13 | 207 | (1954) |
| 5. | LAUTSCH, W. u. Mitarb. | Naturwiss. | 38 | 210 | (1951) |
| | " | " | 38 | 260 | (1951) |
| | " | " | 38 | 478 | (1951) |
| | " | Kolloid-Z. | 125 | 72 | (1952) |
| | BROSER, W. LAUTSCH, W. | Z .Naturforsch. | 8b | 711 | (1953) |
| | LAUTSCH, W. u. Mitarb. | Kolloid-Z. | 138 | 129 | (1954) |
| | " | Z.Naturforsch. | 9b | 277 | (1954) |
| | " | Angew.Chem. | 66 | 123 | (1954) |
| | " | Kolloid-Z. | 141 | 132 | (1955) |
| | " | " | 144 | 82 | (1955) |
| | BROSER, W. LAUTSCH, W. | Naturwiss. | 42 | 513 | (1955) |
| | LAUTSCH, W. u. Mitarb. | Z.Naturforsch. | 11b | 282 | (1956) |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | BROSER, W.<br>LAUTSCH, W. | Z.Naturforsch. | 11b | 453 | (1956) |
| | LAUTSCH, W.<br>u.Mitarb. | Z.Naturforsch. | 12b | 303 | (1957) |
| | " | Z.Elektrochem. | 61 | 174 | (1957) |
| | " | Oesterr,Chem.-Ztg. | 58 | 33 | (1957) |
| | " | Z.Naturforsch. | 12b | 307 | (1957) |
| | " | Chem.Ber. | 90 | 470 | (1957) |
| | " | Monatsh.Chem. | 88 | 432 | (1957) |
| | " | Kolloid-Z. | 161 | 1 | (1958) |
| | " | Chimia | 13 | 129 | (1959) |
| | LAUTSCH, W. | Kolloid-Z. | 167 | 144 | (1959) |
| 6. | BRAND, E.<br>EDSALL, J.T. | Annu.Rev.Biochem. | 16 | 223 | (1947) |
| 7. | ZEILE, K.<br>PIUTTI, P. | Z.physiol.Chem. | 218 | 52 | (1933) |
| 8. | GEHRMANN, W. | Diplomarbeit F.U. Berlin | | | 1955 |
| | LAUTSCH, W.<br>u.Mitarb. | Chem.Ber. | 90 | 470 | (1957) |
| 9. | GEHRMANN, W. | Dissertation F.U. Berlin | | | 1960 |
| 10. | SHEEHAN, J.C.<br>HESS, G.P. | J.Amer.Chem.Soc. | 77 | 1067 | (1955) |
| 11. | GOLDSCHMIDT, St.<br>LAUTENSCHLAEGER, H. | Liebigs Ann.Chem. | 580 | 68 | (1953) |
| 12. | HUNT, M.<br>du VIGNEAUD, V. | J.Biol.Chem. | 124 | 669 | (1938) |
| 13. | du VIGNEAUD, V.<br>SIFFERD, R.H. | J.Biol.Chem. | 108 | 753 | (1935) |
| 14. | KUHN, R.<br>HAAS, H.J. | Angew.Chem. | 67 | 785 | (1955) |
| 15. | BOISSONNAS, R.A. | Helv.Chim.Acta | 34 | 874 | (1951) |
| 16. | CURTIUS, Th. | J.Prakt.Chem. | 70 | 57 | (1904) |
| 17. | BERGMANN, M.<br>ZERVAS, L. | Ber. | 65 | 1192 | (1932) |
| 18. | GRASSMANN, W.<br>WUENSCH, E. | Chem.Ber. | 91 | 449 | (1958) |
| 19. | BEN-ISHAI, D.<br>BERGER, A. | J.Org.Chem. | 17 | 1564 | (1952) |
| 20. | du VIGNEAUD, V.<br>BEHRENS, O.K. | J.Biol.Chem. | 117 | 27 | (1937) |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 21. | HELFERICH, B.<br>MOOG, L.<br>JUENGER, A. | Ber. | 58 | 872 | (1925) |
| | HILLMANN-ELIES, A.<br>HILLMANN, G.<br>JATZKEWITZ, H. | Z.Naturforsch. | 8b | 445 | (1953) |
| 22. | BAER, E.<br>u.Mitarb. | Canad.J.Chem. | 34 | 1182 | (1956) |
| 23. | ZERVAS, L.<br>THEODOROPOULOS, D.M. | J.Amer.Chem.Soc. | 78 | 1359 | (1956) |
| 24. | THEODOROPOULOS, D.M. | J.Org.Chem. | 21 | 1550 | (1956) |
| 25. | BELLAMY, L.J. | "Ultrarot-Spektrum und chemische Konstitution" | | Darmst. | 1955 |
| 26. | WARBURG, O.<br>NEGELEIN, E. | Biochem.Z. | 113 | 257 | (1921) |
| 27. | KEILIN, D. | Proc.Roy.Soc.(B) | 100 | 129 | (1926) |
| | FISCHER, H.<br>TREIBS, A.<br>ZEILE, K. | Z .physiol.Chem. | 193 | 138 | (1930) |
| | LANGENBECK, W. | Ber. | 65 | 842 | (1932) |
| | LAUTSCH, W.<br>BOEDEFELD, E. | Chimia<br>Diplomarbeit F.U.Berlin | 13 | 141 | (1959)<br>1959 |
| 28. | LAUTSCH, W.<br>u. Mitarb. | Kolloid-Z. | 144 | 100 | (1955) |
| | " | " | 161 | 24,34 | (1958) |
| | " | Chimia | 13 | 136 | (1959) |
| 29. | LAUTSCH, W. | Kolloid-Z. | 166 | 55 | (1959) |
| | " | " | 167 | 144 | (1959) |
| 30. | LAUTSCH, W.<br>BOEDEFELD, E. | Chimia<br>Diplomarbeit F.U.Berlin | 13 | 141 | (1959)<br>1959 |
| 31. | THEORELL, H. | "Advances in Enzymology VII" | | New York | 1947 |
| | EHRENBERG, A.<br>THEORELL, H. | Acta chem. Scand. | 9 | 1193 | (1955) |
| 32. | TREIBS, A.<br>WIEDEMANN, E. | Liebigs Ann.Chem. | 471 | 206 | (1929) |
| 33. | FISCHER, H.<br>ORTH, H. | "Die Chemie des Pyrrols" II/2 S.58 | | Leipzig | 1940 |
| 34. | FISCHER, H.<br>Puetzer, B. | Z.physiol.Chem. | 154 | 39 | (1926) |

35. FISCHER, E. Ber. 36 2982 (1903)
" 39 2921 (1906)
WILSON, E.J. J.Org.Chem. 7 126 (1942)
PACSU, E.

36. HILL, R. Proc.Roy.Soc.(B) 107 205 (1933)

37. PAUL, K.G. Acta chem.scand. 2 434 (1948)

38. FISCHER, E. Ber. 39 462 (1906)

39. DOHERTY, D.G. J.Biol.Chem. 189 447 (1951)
POPENOE jr., E.A.

40. FOSTER, G.L. Org.Synthesis Collect.Vol.II s.330
SHEMIN, D.

41. FISCHER, E. Ber. 34 2868 (1901)
FOURNEAU, E.

42. FISCHER, E. Ber. 34 2870 (1901)
FOURNEAU, E.

43. SCHRAMM, G. Makromol.Chem. 13 103 (1954)
RESTLE, H.

44. BAILEY, J.L. J.Chem.Soc. 4 3461 (1950)

45. FISCHER, E. Ber. 39 2893 (1906)

46. CIPERA, J.D. Chem.and Ind. 16 (1955)
NICHOLLS, R.V.V.

47. ZSCHENDERLEIN, P. † unvollendete Diplomarbeit F.U.Berlin

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Organische Chemie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Meinem sehr verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. W. Lautsch, danke ich für das Thema der Arbeit, für viele wertvolle Anregungen und Diskussionen und für die mir in jeder Beziehung gewährte großzügige Unterstützung.

## Lebenslauf

Am 8. August 1921 wurde ich, Bruno Wiemer, als Sohn des Schmiedemeisters Franz Wiemer und seiner Ehefrau Helene, geb. Perlbach, in Insterburg (Ostpr.) geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule und der Oberschule in Insterburg legte ich im März 1939 die Reifeprüfung ab.

Im April 1939 kam ich zum Arbeitsdienst und im November 1939 zur Wehrmacht. Bei Kriegsende geriet ich in russische Gefangenschaft, aus der ich am 1o. November 1948 entlassen wurde.

Während des Krieges wurde ich für das Wintersemester 1943/44 von der Wehrmacht zum Studium beurlaubt. Ich studierte an der Universität Königsberg Chemie. Ab Mai 1949 setzte ich das Studium an der Freien Universität Berlin fort. Am 4. März 1955 bestand ich die Diplom-Hauptprüfung, nachdem ich vorher unter Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Lautsch meine Diplomarbeit "Kritische Untersuchung der Polykondensation von DL-Alanylglycylglycinmethylester beim Erhitzen in festem und geschmolzenem Zustand" durchgeführt hatte. Im Anschluß daran begann ich mit der vorliegenden Doktorarbeit.

Seit April 1957 bin ich wissenschaftlicher Assistent am Institut für Organische Chemie der Freien Universität Berlin.